

**Nachweis von Elafin und sekretorischem Leukozyten  
Proteaseinhibitor in gingivaler Sulkusflüssigkeit bei Patienten mit  
Parodontitis**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae dentariae  
(Dr. med. dent.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Martin Schacht  
geboren am 17.05.1984 in Schwerin

1. Gutachter: Prof. Dr. W. Pfister, Jena
2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. B. Sigusch, Jena
3. Gutachter: Prof. Dr. S. Eick, Bern

Tag der öffentlichen Verteidigung: 04.07.2017

## **Abkürzungsverzeichnis**

A. actinomycetemcomitans, A.a.	Aggregatibacter actinomycetemcomitans
APS	Ammoniumpersulfat
BoP	Blutungsindex - Blüten nach Sondieren (Bleeding on Probing)
BApNA	N $\alpha$ -Benzoyl-DL-Arginine-p-Nitroanilid
DSMO	Dimethylsulfoxid
ELISA	Enzymlinked Immunosorbent Assay
ECL	enhanced Chemolumineszenz
fMLP	N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin
GCF	gingival crevicular fluid, Sulkusflüssigkeit
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-
	Ethansulfonsäure
IG	Immunglobuline
IL	Interleukine
LOS	Lipooligosaccharid
LPS	Lipopolysaccharid
MMP	Matrix-Metalloproteinase
NE	Neutrophile Elastase
PCR	Polymerase Chain Reaktion
P.gingivalis, P.g.	Porphyromonas gingivalis
PMNL	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PR3	Proteinase 3
SDS-PAGE	Sodiumdodecyl –
	Polyacrylamidgelelektrophorese
SLPI	secretory leucocyte protease inhibitor
T.denticola, T.d.	Treponema denticola
T.forsythia, T.f.	Tannerella forsythia
TIMP	Tissue Inhibitor of Matrix-Metalloproteinase
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRIS-HCl	TRIS-Hydrochlorid
TeMeD	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>8</b>
2.1	PARODONTALERKRANKUNGEN .....	8
2.2	MIT PARODONTITIS ASSOZIIERTE BAKTERIENSPEZIES .....	11
2.3	NEUTROPHILE SERINPROTEASEN UND IHRE INHIBITOREN .....	19
2.4	WIRKUNG VON <i>P. GINGIVALIS</i> AUF NEUTROPHILE SERINPROTEASEN UND IHRE INHIBITOREN .....	26
<b>3</b>	<b>ZIELSTELLUNG .....</b>	<b>27</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>28</b>
4.1	STUDIEN TEILNEHMER .....	28
4.2	GEWINNUNG DER SULKUSFLÜSSIGKEIT .....	29
4.3	BESTIMMUNG DER ENZYMAKTIVITÄTEN VON NEUTROPHILER ELASTASE UND PROTEINASE 3 .....	29
4.3.1	Neutrophile Elastase .....	29
4.3.2	Proteinase 3 .....	30
4.4	MIKROBIOLOGISCHER NACHWEIS DES PARODONTOPATHOGENEN KEIMSPEKTRUMS .....	30
4.4.1	Vorbereitung: DNA-Extraktion aus der Sulkusflüssigkeit.....	30
4.4.2	<i>DNA-Strip zur Bestimmung der vorhandenen parodontopathogenen Bakterien.....</i>	<i>31</i>
4.4.3	Realtime-PCR zur Bestimmung der Keimzahlen von <i>P.gingivalis</i> .....	34
4.5	ENZYMAKTIVITÄT DER ARGININ-SPEZIFISCHEN GINGIPAIN (RGP).....	34
4.6	BESTIMMUNG DER PROTEASE-INHIBITOREN SLPI UND ELAFIN.....	35
4.6.1	<i>Secretory leukocyte protease inhibitor .....</i>	<i>35</i>
4.6.2	<i>Elafin .....</i>	<i>35</i>
4.7	DATENANALYSE.....	39
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>40</b>
5.1	KLINISCHE WERTE.....	40
5.2	AKTIVITÄT DER SERINPROTEASEN NEUTROPHILE ELASTASE UND PROTEINASE 3 .....	41
5.3	MIKROBIOLOGISCHER NACHWEIS DES PARODONTOPATHOGENEN KEIMSPEKTRUMS .....	43
5.3.1	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans .....</i>	<i>43</i>
5.3.2	<i>Porphyromonas gingivalis.....</i>	<i>44</i>
5.3.3	<i>Tannerella forsythia .....</i>	<i>46</i>
5.3.4	<i>Treponema denticola.....</i>	<i>47</i>
5.3.5	<i>Prevotella intermedia.....</i>	<i>48</i>
5.4	ENZYMAKTIVITÄT DER ARGININSPEZIFISCHEN CYSTEINPROTEASEN .....	49
5.5	PROTEASEN-INHIBITOREN .....	50

5.5.1	Secretory Leucocyte Protease Inhibitor .....	50
5.5.2	Elafin .....	50
5.6	ASSOZIATION ZWISCHEN SERINPROTEASEN, SERIN-PROTEASEINHIBITOREN UND <i>P. GINGIVALIS</i> .....	53
<b>6</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>55</b>
6.1	METHODIK .....	55
6.2	GINGIPAIN, SERINPROTEASEN UND SERINPROTEASEINHIBITOREN.....	59
<b>7</b>	<b>SCHLUSSFOLGERUNGEN</b> .....	<b>63</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>64</b>
	<b>ANHANG</b> .....	<b>80</b>

# **1 Zusammenfassung**

Die hohe Prävalenz der Parodontalerkrankungen in der Gesamtbevölkerung wird immer wieder durch epidemiologische Studien aufgezeigt. Ursächlich sind vor allem parodontalpathogene Mikroorganismen, die sich im subgingivalen Biofilm akkumulieren, direkt das umliegende Gewebe schädigen und die entzündliche Immunantwort auslösen.

Eine effektive Wirtsabwehr gegen diese Mikroorganismen wird primär von den mit Serinproteasen beladenen Neutrophilen Granulozyten getragen. Normalerweise wird die extrazelluläre Aktivität dieser Serinproteasen wie der Neutrophile Elastase und der Proteinase 3 durch endogene Inhibitoren fein reguliert.

In vitro werden die von Epithelzellen produzierten Serinproteaseinhibitoren Elafin und der sekretorische Leukozyten Proteaseinhibitor (SLPI) durch Gingipaine gespalten. Gingipaine sind Cysteinproteasen, die vom Parodontalpathogen *Porphyromonas gingivalis* als Hauptvirulenzfaktor gebildet werden und für die Schlüsselrolle dieses Bakteriums bei Parodontalerkrankungen verantwortlich sind.

Ziel dieser Pilotstudie war es, die Konzentrationen an Serinproteaseinhibitoren in menschlicher Sulkusflüssigkeit zu bestimmen und mit der Gingipainaktivität ins Verhältnis zu setzen, um die in-vitro Ergebnisse in-vivo zu bestätigen.

Dafür wurde die Sulkusflüssigkeit von insgesamt 31 Patienten (9 gesunden, 7 mit Gingivitis, 10 mit chronischer und 5 mit aggressiver Parodontitis) untersucht und die Konzentrationen an Elafin und SLPI ermittelt. Gleichzeitig wurde die Aktivität der Neutrophilen Elastase, der Proteinase 3 und der arginin-spezifischen Gingipaine (Rgps) in der Sulkusflüssigkeit bestimmt und ein mikrobieller Nachweis für die Parodontalpathogene *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* und *Prevotella intermedia* geführt.

Die gefundenen Elafinmengen unterschieden sich dabei signifikant zwischen den einzelnen Gruppen. Die größten Elafinkonzentrationen wurden in der Sulkusflüssigkeit der Patienten mit aggressiver Parodontitis nachgewiesen. Die kleinsten traten in der gesunden Kontrollgruppe auf.

Die Ergebnisse zeigen deutlich eine positive Korrelation zwischen der nachgewiesenen Elafinkonzentration, der Präsenz der Parodontalpathogene *P. gingivalis*, *T. forsythia* und *T. denticola*, und der Enzymaktivität der Gingipaine.

Die Aktivität der neutrophilen Elastase selbst, korreliert ebenfalls mit den Bakterien des roten Komplexes, jedoch nicht mit der Elafinkonzentration.

SLPI, als Proteaseinhibitor, der wahrscheinlich einen Basalschutz für das Gewebe vermittelt, wurde am stärksten bei den gesunden Patienten nachgewiesen und in deutlich geringeren Konzentrationen in der mit *P. gingivalis* infizierten Sulkusflüssigkeit.

Parodontalpathogene Bakterien stimulieren die Aktivität der neutrophilen Serinproteasen NE und PR3. Aufgrund des proteolytischen Abbaus ihrer lokalen, endogenen Inhibitoren Elafin und SLPI durch bakterielle und wirtseigene Proteasen, wird das empfindliche Protease-Proteaseinhibitor-Gleichgewicht gestört und mündet in einer fehlenden Inhibition der Serinproteaseaktivität, vermehrter Gewebedestruktion und verminderter Inflammationsauflösung.

## **2 Einleitung**

### **2.1 Parodontalerkrankungen**

Parodontalerkrankungen sind der Oberbegriff für alle entzündlichen und nicht entzündlichen Veränderungen des Zahnhalteapparates.

Die zur Zeit gültige Einteilung der Parodontalerkrankungen wurde 1999 in der internationalen Konsensuskonferenz durch die „Klassifikation der parodontalen Erkrankungen und ihrer Zustände“ (Armitage 1999) in Oak Brook, Illinois, USA festgelegt. Diese hat sich als anerkanntes Klassifizierungssystem durchgesetzt. Es wurden dabei acht Hauptgruppen unterteilt.

Die Hauptgruppe I umfasst alle Formen von Gingivopathien. Dies betrifft sowohl plaque-induzierte Gingivitiden (z. B. NUG und Schwangerschaftsgingivitis) als auch nicht plaque-induzierte gingivalen Erkrankungen, die sich aufgrund viraler, pilzassoziierter, traumatischer, allergischer oder aufgrund systemischer Erkrankungen manifestieren.

Die Gingivitis kann in eine akute und chronische Form eingeteilt werden, die in überwiegender Mehrheit auf eine vermehrte dentale Plaqueakkumulation am Gingivalrand zurückzuführen ist.

Klinisch sind bei allen Formen die fünf klassischen Entzündungszeichen nach Galen und Celsus (Rötung, Schwellung, Blutung auf Sondieren oder spontan, Dolor, sowie eine eingeschränkte Funktion der Oberflächenintegrität als Diffusionsbarriere) erkennbar. Auch Ulzerationen und Pseudotaschen (erhöhte Sondierungstiefe ohne Attachmentverlust) können auftreten. Die Fließrate der Sulkusflüssigkeit ist gegenüber der gesunden Gingiva erhöht.

Die Plaquezusammensetzung verschiebt sich bei Zunahme der Biofilmdicke von grampositiven, fakultativ anaeroben Pionierkeimen zu mehr gramnegativen und anaeroben Bakterien. Durch Beseitigung der dentalen Plaque kommt es zur Regression der Entzündung und der klinischen Symptome. Eine Gingivitis ist vollständig reversibel (Gängler et al. 2005).

Die Kategorie II beinhaltet die chronische Parodontitis. Sie ist die am häufigsten auftretende Form der Parodontitis. Die chronische Parodontitis ist eine meist bei



Erwachsenen vorkommende entzündliche, durch bakterielle Plaque verursachte Erkrankung, die mit Destruktion aller parodontalen Strukturen und Attachmentverlust einhergeht.

Die Erkrankungsprogression erfolgt meist langsam und schubweise, Phasen der Aktivität wechseln sich mit Stagnationsphasen ab (Hellwig et al. 2006).

Diagnostische Zeichen sind die erhöhten Sondierungstiefen, als Ausdruck der parodontalen Destruktion, die mit der akkumulierten Plaquemenge korrelieren. Des Weiteren sind die klinischen Zeichen einer Entzündung sowie supra- und subgingivale Zahnsteinablagerungen und gingivale Rezessionen charakteristisch.

Ausgelöst und aufrechterhalten wird die Erkrankung durch die Veränderung des Keimspektrums, wobei mit Zunahme der akkumulierten Plaquedicke vermehrt gramnegative, anaerobe Mikroorganismen und Spirochäten auftreten. Durch die Interaktion dieser parodontalpathogenen Bakterienspezies mit der wirtseigenen Immunabwehr wird die parodontale Gewebedestruktion initiiert und vorangetrieben. Als wichtige Leitkeime für die chronische Parodontitis haben sich dabei *Porphyromonas gingivalis* (Lopez 2000), *Tannerella forsythia* und *Treponema denticola* herauskristallisiert (Socransky et al. 1998) (Borrell und Papapanou 2005) (Holt und Ebersole 2005).

Hauptgruppe III umfasst die aggressive Parodontitis. Klinisch auffällig bei dieser Form der entzündlichen Parodontalerkrankung ist der frühzeitige Erkrankungsbeginn in der Pubertät oder frühen Adoleszenz.

Die aggressive Parodontitis ist von häufigen Aktivitätsschüben und einer raschen Progredienz der parodontalen Destruktion geprägt, die nicht mit den supra- und subgingivalen Plaqueablagerungen korreliert. Dabei können die Entzündungszeichen nur gering oder gar nicht ausgeprägt sein. Die lokalisierte Form beginnt zunächst an den ersten Molaren und den Schneidezähnen, die Stadien zum Übergang in die generalisierte Form sind fließend.

Mikrobiologisch umfasst das Erregerspektrum der aggressiven Parodontitis ebenfalls gramnegative, anaerobe Mikroorganismen und Spirochäten, die auch bei schweren chronischen Parodontiden vorkommen.

Als wichtige pathogene Spezies ist der gegenüber der Kategorie II (Armitage 1999) gehäuft auftretende *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Yang et al. 2005) und auch seine Koexistenz mit *T. forsythia* (Page und Schroeder 1976, Page und

Schroeder 1982, Moore und Moore 1994) herauszuheben und unterstreicht seine Position als Leitkeim der aggressiven Parodontitis.

Eine familiäre Häufung der aggressiven Parodontitis kann häufig beobachtet werden und wird mit einer angeborenen überschießenden Immunantwort in Verbindung gebracht. Die Betroffenen weisen häufig eine abnormale Phagozytenfunktion und hyperreagierende Makrophagenphänotypen auf, die vermehrt die gewebedestruierenden Faktoren ( $\text{PGE}_2$  und  $\text{IL-1}\beta$ )(Lang et al. 1999) produzieren und damit das Ausmaß des entzündlichen Abbaus von Extrazellulärmatrixbestandteilen vervielfachen können(Page 1991). Dadurch werden Chemotaxis und Migration der neutrophilen Granulozyten und Monozyten gestört und ein Abtöten von *A. actinomycetemcomitans* durch die PMNL verhindert (Hellwig et al. 2006). Bei frühzeitiger Diagnostik und Therapie spricht die aggressive Parodontitis meist sehr gut auf die Behandlung an und kann in ihrer Progredienz gestoppt werden.

Die Hauptgruppen IV-VIII beinhalten die Parodontopathien als Manifestation von Systemerkrankungen, die nekrotisierenden Parodontalerkrankungen, die Parodontalabszesse, die Parodontitis im Zusammenhang mit endodontalen Läsionen und entwicklungsbedingte oder erworbene Deformitäten und Zustände(Armitage 1999).

Gingivitis, chronische und aggressive Parodontitis sind die Erkrankungen mit der größten Prävalenz.

Parodontalerkrankung treten in der Bevölkerung häufig auf. Bei 26% der Erwachsenen sind die klinischen Zeichen einer Gingivitis erkennbar. Mit einer Prävalenz von 73% ist die Parodontitis bei fast drei Viertel aller Erwachsenen nachweisbar, wobei circa ein Fünftel dieser Patienten an einer schweren Form (Grad 4 CPI)(Ainamo et al. 1982) der Parodontitis leidet. Nur lediglich 0,5 % der Erwachsenen weisen keine Erkrankungszeichen auf (Hoffmann et al. 2006).

Die Mundhöhle als biologisches Habitat umfasst ungefähr 500-700 verschiedenen Bakterienspezies (Aas et al. 2005) von denen ca. 400 Arten auch im subgingivalen Biofilm nachgewiesen werden können (Kroes et al. 1999, Paster et al. 2001).

Parodontalerkrankungen sind multifaktorielle, opportunistische Erkrankungen, die durch mit dem Wirt interagierende, polybakterielle Komplexe ausgelöst werden und

durch die Freisetzung von Entzündungsmediatoren, Zytokinen und Chemokinen zur Destruktion der parodontalen Strukturen führt (Kortsik et al. 2003).

## **2.2 Mit Parodontitis assoziierte Bakterienspezies**

Die wichtigsten parodontalpathogenen Erreger sind die als „roter“ und „oranger Komplex“ zusammengefassten Mikroorganismen und der dem grünen Komplex zugeordnete *A. actinomycetemcomitans* (Socransky und Haffajee 2002).

Der rote Komplex enthält *P. gingivalis*, *T. forsythia* und *T. denticola*, diese Keime werden häufiger in parodontalen Läsionen gefunden als in parodontal gesunden Stellen (Borrell und Papapanou 2005).

Der orange Komplex enthält unter anderem die Bakterienspezies *Prevotella intermedia*, *Parvimonas micra* und *F. nucleatum*. Der Gattung *Fusobacterium* kommt dabei eine entscheidende Rolle als Brückenbauer für die weitere Besiedlung und Organisation des Biofilms zu (Kolenbrander und London 1993, Kolenbrander 2000).

Neben den Mikroorganismen tragen eine Reihe an Risikofaktoren zur Pathogenese der Parodontitis bei. Ein schlecht eingestellter Diabetes mellitus (Typ II) (Graves et al. 2005), Tabakkonsum und unzureichende Mundhygiene wurden als wesentliche Risikofaktoren identifiziert. Systemische Erkrankungen, genetische Einflüsse, Immunsuppression, Mangelernährung und Stress sind weitere potentielle Faktoren, die die Erkrankungskinetik beeinflussen (Marsh und Martin 2003, Kinane et al. 2006).

### **Aggregatibacter actinomycetemcomitans**

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ist ein opportunistisches, gramnegatives, unbewegliches kokkoides Stäbchen, das als mikroaerophil, capnophil und fakultativ anaerob beschrieben wurde, obwohl bei Anzüchtung anaerobe Bedingungen am besten geeignet scheinen (Fives-Taylor et al. 1996, Fives-Taylor et al. 1999, Marsh und Martin 2003)

*A. actinomycetemcomitans* kann sowohl in der Mundhöhle Gesunder als auch bei allen Formen der Parodontitis nachgewiesen werden, dabei nimmt er jedoch bei der

aggressiven Parodontitis ein Schlüsselrolle ein und wird hier besonders häufig nachgewiesen(Slots et al. 1980, Slots 1999, Yang et al. 2005).

Die Adhärenz an die Strukturen der Mundhöhle und Epithelzellen wird vor allem durch die auf der Oberfläche angeordneten Fimbrien vermittelt(Henderson et al. 2003, Henderson et al. 2010).

*A. actinomycetemcomitans* bildet verschiedene Virulenzfaktoren, die in die Immunabwehr beeinflussen.

Das von ihm gebildete Leukotoxin A , welches zur RTX-Familie (repeats in Toxin) gehört kann sowohl oberflächengebunden als auch in Lipopolysaccharidvesikeln gespeichert werden (Kachalany 2010).

Durch zellspezifische Adhäsion über den  $\beta 2$ - Integrinrezeptor LFA-1 (Lally et al. 1997) bindet das Leukotoxin A an Leukozyten und ist in der Lage, durch Porenbildung (Holt und Ebersole 2005) oder Lyse die Abwehrfunktion von polymorphkernigen Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten (Gängler et al. 2005) zu unterbinden und gleichzeitig für eine massive Freisetzung wirtseigener Proteasen zu sorgen (O'Brien-Simpson et al. 2004).

Darüber hinaus produziert *A. actinomycetemcomitans* ein zytoletales distending Toxin als weiteren immunsuppressiven Virulenzfaktor. Seine DNase-Aktivität löst in Lymphozyten einen G2-Arrest während des Zellzyklus aus und induziert über Aktivierung der Caspase-Kaskade die Apoptose in T-Zellen(Shenker et al. 2001). Ein weiteres von ihm produziertes Protein soll als Super-Antigen fungieren und über Bindung des T-Zellrezeptors ebenfalls die T-Zellapoptose induzieren(Raja et al. 2014).

Die Produktion und Bereitstellung von OMP34 (outer membrane proteins) auf seiner Oberfläche befähigt *A. actinomycetemcomitans*, der Opsonierung durch die humorale Immunabwehr zu entgehen. Das Fc- Bindungsprotein verhindert damit die erleichterte Phagozytose durch die PMNL(Henderson et al. 2010).

## **Porphyromonas gingivalis**

*Porphyromonas gingivalis* ist ein kleines, gramnegatives, anaerobes, assaccharolytisches Stäbchen, welches schwarz pigmentiert ist. Er ist stark assoziiert mit den schweren Parodontiden und kommt in der Plaque gesunder Patienten nur selten vor (Yun et al. 1999).

*P. gingivalis* ist durch eine mit Fimbrien besetzte Kapsel nach außen gegen Phagozytose geschützt (Marsh und Martin 2003).

Mit Hilfe seiner Fimbrien gelingt *P. gingivalis* die Adhäsion an orale Epithelzellen, die Zahnoberfläche und die Koaggregation mit anderen Bakterien seiner Spezies oder anderen Spezies (Hamada et al. 1998, Kataoka et al. 1999, Budu et al. 2003).

Auch seine Kapselpolysaccharide, aufgrund derer sechs Serotypen unterschieden werden können, sowie Hämagglutinine und Proteasen sind an der Adhärenz von *P. gingivalis* beteiligt. (Holt und Ebersole 2005)

Als wichtigsten Virulenzfaktor besitzt *P. gingivalis* hoch aktive Cysteinproteasen (Gingipaine), die arginin- oder lysinspezifisch Peptidbindungen spalten können. Die arginin-spezifischen Gingipaine (RgpA und RgpB) werden durch zwei Gene kodiert. Das hochaktive RgpA besitzt eine Hämagglutinin-spezifische Adhäsionsdomäne, die RgpB fehlt (Potempa et al. 2003).

Die lysinspezifische Protease (Kgp) wird nur auf einem Gene kodiert wird und spaltet nur nach Lysinresten, besitzt aber ebenfalls eine dem RgpA-ähnliche Hämagglutinin-Adhäsionsdomäne (Potempa et al. 2003, Simpson et al. 2004).

Die löslichen, als auch zell-assoziierten Gingipaine sorgen für die Nährstoffsicherstellung und durch Interaktion mit wirtseigenen Abwehrmolekülen für eine Modulation der Immunabwehr (Imamura 2003).

Die Gingipaine sind in der Lage, Immunglobuline (IgG, IgA, sIgA, C3), Kollagen (Typ I und IV), Komplementfaktoren, eisen- und häminbindende Proteine, Glykoproteine und Entzündungsmediatoren (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8) abzubauen (Potempa et al. 2000). Damit aktivieren Sie das Kallikrein/Kinin-System, die Blutgerinnungskaskade, lösen Proteine der extrazellulären Matrix, wie z.B. Fibrinogen und Laminin, auf und inhibieren die Produktion freier Sauerstoffradikale durch die PMNL (Kadowaki et al. 1994, Holt und Ebersole 2005).

Die parodontale Gewebedestruktion durch *P. gingivalis* wird über die Fähigkeit der Arg-Gingipaine zur Spaltung von Kollagen, Fibronectin, Albumin und Laminin vermittelt (Budu et al. 2003).

Das Aufbrechen der Fibrinogen-Integrin-Verbindungen in gingivalen Fibroblasten durch RgpA und B führt zum Verlust der epithelialen Integrität des Sulkusepithels und des Zahnhalteapparates, da diese dann die Apoptose einleiten (Baba et al. 2001, Holt und Ebersole 2005, Stathopoulou et al. 2009).

*P. gingivalis* bindet eisenhaltige Moleküle und spaltet Hämin (Mekalanos 1992, Kuboniwa et al. 2001, Simpson et al. 2004, Holt und Ebersole 2005, Byrne et al. 2013).

Speicherformen des Häms bieten *P. gingivalis* Schutz gegenüber toxischen Sauerstoffradikalen von  $H_2O_2$  und sind wahrscheinlich an der Ausbildung des anaeroben Milieus beteiligt (Sztukowska et al. 2002, Byrne et al. 2013).

Auch die Stoffwechselendprodukte von *P. gingivalis* haben toxische Einflüsse auf das umgebende Gewebe und steigern so seine Virulenz.

Flüchtige, kurzkettige Fettsäuren können die orale Mukosa durchdringen und inhibieren dort die Lymphozytenproliferation, Zytokinproduktion in T und B-Lymphozyten und leiten die T-Zell Apoptose ein (Harris et al. 2002). Dadurch wird eine tiefere Penetration des Bakteriums in die Gingiva und die Gewebedestruktion ermöglicht (Banbula et al. 2001, Takahashi, 2003)

*P. gingivalis* spaltet in seinem Stoffwechsel Ammoniak von einer Vielzahl von Peptiden ab. Diese puffert das saure Milieu bei der Produktion der Fettsäuren und schützt *P. gingivalis* vor der unspezifischen Immunabwehr durch negative Beeinflussung der neutrophilen Granulozytenfunktion (Takahashi, 2003).

Die Lipopolysaccharide von *P. gingivalis* lösen als Endotoxin in Kontakt mit Lymphozyten und Monozyten eine erhöhte IL-1, TNF und  $PGE_2$ -Sekretion aus, die durch Osteoklastenaktivierung den Knochenabbau stimuliert (Nishida et al. 2001).

Die Anwesenheit der Lipopolysaccharide von *P. gingivalis* führt zu einer vermehrten Expression an IL-8 und MCP-1 und ICAM-1 in endothelialen Zellen, welche dieser anschliessend direkt spalten kann (Kobayashi-Sakamoto et al. 2003, Tada et al. 2003). Gleichzeitig wirkt sich das LPS negativ auf die Beseitigung apoptotischer

PMNL durch Makrophagen aus und ermöglicht so das Fortbestehen der Entzündungsantwort (Olsen und Hajishengallis 2016).

*P. gingivalis* ist in der Lage das Komplementsystem zu modulieren, da seine Gingipaine den Komplementfaktor C3 spalten (Wingrove et al. 1992, Jagels et al. 1996, Potempa et al. 2000, Potempa et al. 2003, Potempa und Pike 2009) und als C5-Convertase den aktiven Komplementfaktor C5a generieren (Darveau et al. 2012).

Die Gingipaine Rgp A und B führen zu einer schnellen Aktivierung von Faktor IX, X und Prothrombin die über den intrinsischen Pfad die Blutgerinnung auslösen. Das gebildete Thrombin aktiviert die Blutplättchen, spaltet aus Fibrinogen Fibrin ab, lockt Leukozyten an und erhöht die Gefäßpermeabilität. Als Folge kommt es zu einer erhöhten Sulkusflüssigkeitsfließrate und zur Migration von PMNL in die aktive parodontale Tasche (Imamura 2003, Potempa et al. 2003) sowie zur Thrombin-vermittelten Osteoklastenaktivierung über die Anregung der PGE2-Sekretion in Osteoblasten.

*P. gingivalis* wird als Keystone-Pathogen (Darveau et al. 2012) die zentrale Rolle zugeschrieben. Ähnlich dem Schlussstein eines romanischen Bogens nimmt *P. gingivalis* die Schlüsselrolle in der Auslösung und Aufrechterhaltung der Parodontitis ein (Darveau et al. 2012, Jusko et al. 2012).

Durch die immunmodulatorische Wirkung der Gingipaine (Krauss et al. 2010) bewirkt *P. gingivalis* eine Veränderung der Zusammensetzung der oralen Keimspektrums (Olsen und Hajishengallis 2016) wodurch die Homöostase des originären oralen Biofilms mit dem Wirt und seinem Immunsystem wird gestört.

Diese Veränderung der Mikrobiota (Dysbiose) scheint den entzündungsbedingten Knochenabbau und somit die Parodontitis auszulösen (Pathirana et al. 2010, Hajishengallis et al. 2012).

### **Treponema denticola**

*Treponema denticola* ist ein bewegliches, asaccharolytisches, obligat anaerobes, gramnegatives, schraubenförmiges Bakterium. Die Spezies kommt bei parodontalen Erkrankungen häufig vor, während sie kaum im Gesunden auftritt (Moore und

Moore 1994). In Analogie zu vielen anderen parodontopathogenen Bakterien weist *T. denticola* ein ausgeprägtes Adhärenzverhalten gegenüber Wirtszellen als auch anderen Bakterienarten auf. *T. denticola* bindet an eine Vielzahl oraler Strukturen wie Hydroxylapatit, Laminin, Kollagen, Fibronectin, Heparin, Epithelzellen und gingivale Fibroblasten (Umemoto et al. 1997, O'Brien-Simpson et al. 2004, Holt und Ebersole 2005). Die Bindung von *T. denticola* an diese Oberflächen, Wirts- oder Bakterienzellen wird über verschiedene Adhäsionsmoleküle wie Msp (Major outer sheath proteins)(Fenno et al. 1996), Dentilisin (chymotrypsin-ähnliche Protease) oder auch LrrA (Leucine-rich repeat protein) vermittelt (Ikegami et al. 2004).

*Treponema denticola* interagiert auch mit anderen Bakterienspezies vor allem mit *P. gingivalis* und *F. nucleatum* (Kolenbrander und London 1993, Kolenbrander 2000). Die Koaggregation zwischen den beiden Vertretern des roten Komplexes wird durch das Dentilisin vermittelt, welches an die Fimbrienproteine von *P. gingivalis* bindet und auch dem Nährstoffaustausch zwischen diesen Bakterien dient (Hashimoto et al. 2003).

*T. denticolas* Dentilisin, welches auch als Chymotrypsin-ähnliche Protease bezeichnet wird, ist eine oberflächengebundene prolyl-phenylalanin spezifische Protease die zytotoxisch auf die umgebenden Epithelzellen wirkt und *T. denticola* zur Invasion oraler Epithelzellen befähigt (Uitto et al. 1995).

Dieses proteolytische Enzym zerstört über den Abbau von Kollagen, Laminin und Fibronectin, die Verbindungsmoleküle der epithelialen Barriere. Diese Permeabilitätserhöhung trägt entscheidend zur Penetration von *T. denticola* in tiefere Gewebsschichten bei (Choi et al. 2003).

Des Weiteren vermittelt Dentilisin den Abbau von Serumproteinen wie Transferrin, Fibrinogen, IgG, sIgA und  $\alpha$ 1-Antitrypsin sowie die Hydrolyse von Substanz P und Angiotension-1 (Holt und Ebersole 2005, Ishihara 2010).

Ein weiterer Virulenzfaktor ist Cystalysin. Diese für den Stoffwechsel von *T. denticola* wichtige Protease hydrolysiert wirtseigene, schwefelhaltige Moleküle wie Cystein und Gluthation und dient der Bereitstellung von Nährstoffen für sein Wachstum. (Chu et al. 1999, Zhang et al. 2010).

*Treponema denticola* besitzt anders als viele andere gram-negative Bakterien ein atypisches LPS in Form eines Lipooligosaccharids (LOS) (Sela 2001). Funktionell stimuliert LOS die Osteoklastendifferenzierung und Expression der MMPs (Choi et al. 2003, Brisette und Lukehart 2007).



Sein Major-Sheath-Protein der Oberfläche ist hat neben seinem Einfluss auf das Adhärenzverhalten über  $\beta$ 1-Integrin auch negativen Einflüsse auf die Fibroblastenmigration und –proliferation, wodurch Wundheilungsprozesse verlangsamt werden (Amin et al. 2004).

Als weiteren Virulenzfaktor produziert *T. denticola* ein immunsuppressives Protein (Sip), welches über den Eingriff in die T-Zellproliferation zur deren irreversiblen Apoptose führt und *T. denticola* vor einer Beseitigung durch die Immunabwehr schützt (Lee et al. 2004).

### **Tannerella forsythia**

*Tannerella forsythia* ist der dritter Vertreter des roten Komplexes (Socransky et al. 1998) und ein asaccharolytisches, gramnegatives, anaerobes, fusiformes Stäbchen (Tanner et al. 1986, Sakamoto et al. 2002).

*T. forsythia* wird häufig in enger Vergesellschaftung mit *P. gingivalis* in subgingivalen Plaqueproben chronischer Parodontiden nachgewiesen (Tanner et al., 1998, Yang et al. 2004, Holt und Ebersole 2005).

Die Kultivierung von *T. forsythia* ist aufgrund der benötigten speziellen Wachstumsfaktoren ( Häm, Menadion, L-Cystein und N-Acetylneuraminsäure) sehr anspruchsvoll (Tanner et al. 1986, Tanner und Izard 2006, Wyss 1989).

Das Adhärenzverhalten von *T. forsythia* gegenüber anderen Bakterien, Wirtszellen und in das Gewebe ist noch nicht bis in letzte Detail entschlüsselt.

Gesichert ist die Koaggregation von *P. gingivalis* und *T. forsythia* mit *F. nucleatum* im subgingivalen Biofilm (Sharma 2010) sowie die Bindung des Bacteroides surface protein A (BspA) von *T. forsythia* hierbei an das LrrA von *T. denticola* (Ikegami et al. 2004, Holt und Ebersole 2005, Tanner und Izard 2006) als auch an Fibrinogen und Fibronectin der extrazellulären Matrix (Bryzek et al. 2014).

*T. forsythia* verfügt über viele Proteasen als Virulenzfaktoren, wie z. B. eine N-benzoyl-Val-Gly-Arg-p-nitroanilid-spezifische Protease (Sharma 2010), eine prth Cysteinprotease mit hämolytischer Aktivität (Saito et al. 1997) und eine Trypsin-

ähnliche Protease (Grenier 1995, Tanner und Izard 2006). Die von Hughes et al. (Hughes et al. 2003) untersuchte  $\alpha$ -D-Glucosidase und N-acetyl- $\beta$ -Glucosaminosidase scheinen durch Proteoglykanspaltung aus dem parodontalen Gewebe die Immunantwort zu beeinflussen und der Nährstoffsicherung zu dienen (Holt und Ebersole 2005).

Als weitere Virulenzfaktoren von *T. forsythia* konnten neuere Studien die Enzyme Karilysin (Jusko et al. 2012) und Miropin (Ksiazek et al. 2015) nachweisen. Karilysin kann durch seine große strukturelle Ähnlichkeit zu Matrixmetalloproteinasen von Säugetieren die Moleküle der Extrazellulärmatrix spalten (Jusko et al. 2012). Es verhindert die Aktivierung der Komplementkaskade sowohl über den klassischen, den alternativen und den Lektin-Weg unter anderem über die Spaltung von C4 und C5, wodurch *T. forsythia* sich effektiv der Erkennung und Beseitigung durch das angeborende Immunsystem entzieht (Jagels et al. 1996, Jusko et al. 2012, Hajishengallis et al. 2015).

Auf Makrophagenoberflächen gebundenes TNF- $\alpha$  wird durch Karilysin abgespalten und induziert durch die Konzentrationserhöhung von löslichem TNF- $\alpha$  sowohl apoptotische als auch pro-inflammatorische Effekte und begünstigt Knochen- und Gewebeabbau (Bryzek et al. 2014).

Ein herauszuhebender Virulenzfaktor *T. forsythias* ist das Serpin Miropin. Dieser Proteaseinhibitor hemmt effizient sehr viele Serin-Proteasen, darunter die von Granulozyten gebildete Elastase und sichert damit *T. forsythia* das Überleben im subgingivalen Biofilm (Ksiazek et al. 2015).

*T. forsythia* produziert ebenfalls flüchtige Schwefelverbindungen, die als Stoffwechselendprodukte ihre toxische Wirkung entfalten können (Torresyap et al. 2003).

Ein weiterer wichtiger Virulenzfaktor der zu Gewebeveränderungen führt, ist das BfLP. Über die Aktivierung der Caspase-8 initiiert das Lipoprotein BfLP Apoptoseprozesse in Zielzellen (Hasebe et al. 2004, Sharma 2010).

Auch das S-Layer Protein, eine der Zellhülle angelagerte Schicht zweier verschiedener, kristalliner Proteine (Sabet et al. 2003, Posch et al. 2011) trägt zu seiner Pathogenität bei. Die S-Layer verzögert die Immunantwort und bietet *T. forsythia* Schutz vor exogenen Faktoren. (Sekot et al. 2001, Sabet et al. 2003)

## **Prevotella intermedia**

*Prevotella intermedia* gehört in die Gruppe der gramnegativen, anaeroben Stäbchen. Die Spezies ist saccharolytisch und wie *P. gingivalis* pigmentiert (Sundqvist 1993, Marsh und Martin 2003) und benötigt für Wachstum, Überleben und seine Virulenz Eisen in Form von Häm (Byrne et al. 2015).

*P. intermedia* besitzt eine Dipeptidyl-Peptase IV (Shibata et al. 2003) und ist in der Lage CD14 und das LPS-bindende Protein (LBP) durch eine membrangebundene Cysteinprotease zu spalten (Deschner et al. 2003) und damit Immunantwort gegenüber LPS zu modulieren.

Ein weitere Cysteinprotease spaltet IgG als Nährstoffquelle und entzieht damit *P. intermedia* und andere Mikroorganismen den Angriffen des erworbenen Immunsystems (Jansen et al. 1995).

*P. intermedia* exprimiert die 90kDa große lösliche Cysteinprotease Interpain A (InpA) die Komplementfaktoren abbauen (Potempa et al. 2009) sowie Hämoglobin und Hämalbumin zur Hämfreisetzung oxidieren und spalten kann (Byrne et al. 2013, Byrne et al. 2015). Interpain A besitzt große Homologie zu Periodontain (PrtP) von *P. gingivalis*. Die Anreicherung des gewonnenen Häms an der Zelloberfläche schützt das Bakterium vor Angriffen der PMNL (Byrne et al. 2013, Byrne et al. 2015).

*P. gingivalis* und *P. intermedia* koaggregieren und werden häufig gemeinsam in der parodontalen Tasche nachgewiesen (Byrne et al. 2013) wobei ihre Virulenzfaktoren z.B. bei der Aquirierung von Häm (Byrne et al. 2013) oder der Hemmung der Komplementkaskade synergistisch wirkten (Potempa et al. 2009).

## **2.3 Neutrophile Serinproteasen und ihre Inhibitoren**

Die chronische Entzündung des parodontalen Gewebes wird durch die Stimulierung oraler Epithelzellen durch bakterielle Antigene hervorgerufen. Diese Aktivierung sorgt für die Initiation des angeborenen Immunsystems über Komplementaktivierung und die massive Infiltration von PMNL, Makrophagen und Lymphozyten in das gingivale Gewebe (Garant 2003). Neutrophile Granulozyten stellen dabei die erste Abwehrlinie der zellulären Wirtsantwort gegenüber der mikrobiellen Infektion dar und machen mehr als 95% aller Leukozyten im gingivalen Sulkus aus (Delima und Van Dyke 2003). Nach ihrer Synthese im Knochenmark, zirkulieren die PMNL in der

Blutbahn und adhären rezeptorvermittelt über  $\beta$ 2-Integrin und ICAM-1 und -2 mit dem Gefäßendothel des gingivalen Plexus in Umgebung des Entzündungsgebietes (Nourshargh et al. 2010).

Nach der chemokin-modulierten Transmission durch das Endothel gelangen die neutrophilen Granulozyten entlang chemotaktischer Gradienten (IL-8, C5a, bakterieller Antigene, LPS, fMLP) zum infizierten gingivalen Epithel (Kolaczowska und Kubes 2013, Olsen und Hajishengallis 2016).

Dieser Extravasationsprozess als Beginn der Entzündungsantwort wird durch endogene Inhibitoren wie Del-1 als Inhibitor der endothelialen Adhäsion über ICAM-1 fein moduliert (Hajishengallis et al. 2015).

Neutrophile Granulozyten besitzen eine Vielzahl an antimikrobiellen und proinflammatorischen Faktoren. Diese bedürfen einer strengen Regulation, um ein Gleichgewicht herzustellen und einem übermäßigen Gewebenabbau entgegenzuwirken.

Die primäre Funktion der neutrophilen Granulozyten ist die Aufnahme der Mikroorganismen in intrazellulär membranständige Phagosomen, wo diese durch die kombinierten Angriffe von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS), Proteasen und antimikrobiellen Peptide unschädlich gemacht werden (Pham 2008).

Die nicht-oxidative Abtötung der Mikroorganismen in Phagosomen wird über in verschiedenen Granula (azurophil, spezifische, gelatinase und sekretorische) (Pham 2008) gespeicherte antimikrobielle Peptide ( $\alpha$ -Defensinen 1-4, Cathelicidin hCAP 18/LL-37) (Gallo et al. 2002, Puklo et al. 2008) und Enzyme (Myeloperoxidase, neutrophile Elastase, Proteinase 3 und Cathepsin G, Gelatinase) (Korkmaz et al. 2008, Pham 2008) und über die von ihnen produzierten neutrophilen extrazellulären Netze (NET) vermittelt, die Pathogene fangen und abtöten (Hajishengallis et al. 2015) können.

Die neutrophilen Serinproteasen attackieren vorrangig bakterielle Oberflächenstrukturen und Virulenzfaktoren und werden entweder aus azidophilen Granula oder durch Zellyse der PMNL in hohen Konzentrationen freigesetzt (Zani et al. 2004). Sie wirken destruierend auf Proteine der extrazellulären Matrix wie Elastin, Kollagen, Fibronektin und Laminin (Korkmaz et al. 2008). Die freigesetzten Proteasen sind somit bei Störung der Protease-Proteaseinhibitor-Homöostase für die entzündliche Gewebeschädigung hauptverantwortlich (Zani et al. 2004).

In der Gingiva wird die inhibitorische Regulation der Serinproteasen hauptsächlich durch lokale Moleküle, wie z.B.  $\alpha$ 1-Antichymotrypsin, dem sekretorischen Leukozyten Proteaseinhibitor (SLPI) und Elafin vermittelt (Williams et al. 2006, Pham 2008).

Auch die neutrophilen Matrixmetalloproteinasen sind vor allem bei unkontrollierter Freisetzung für die parodontale Gewebedestruktion von entscheidender Bedeutung. Des Weiteren sind neutrophile Granulozyten zur Synthetisierung von C-X-C und C-C Chemokinen befähigt, die sowohl pro- als auch anti-inflammatorische und immunregulatorische Eigenschaften besitzen (Scapini und Cassatella 2014, Hajishengallis et al. 2015).

Neutrophile Granulozyten sind trotz ihrer eigentlich protektiven Abwehrfunktion, entscheidend an die Initiation und Progression der Parodontitis gekoppelt. Eine fein regulierte Homöostase wird durch bakterielle Antigene aus dem Gleichgewicht gebracht und durch wirtsabhängige Immundefizite oder immunregulatorische Defekte zusätzlich moduliert (Jagels et al. 1996, Potempa et al. 2000, Potempa und Pike 2009).

Diese Gleichgewichtsveränderung zeigt sich auch bei angeborenen Defekten, die auf Produktion, Adhärenz, Chemotaxis und Phagozytose der PMNL Einfluss nehmen (Papillon-Lefèvre, kongenitale Neutropenie, Leukozytenadhäsionsdefizit) (Deas et al. 2003, de Haar et al. 2006, Guentsch et al. 2009, Summers et al. 2010) und spielt auch beim raschen Gewebeabbau der aggressiven Parodontitis eine Rolle (Hajishengallis et al. 2015).

Die Homöostase der Entzündungsvorgänge, die durch neutrophile Granulozyten vermittelt werden, wird durch empfindliche Regulationsmechanismen gesteuert. Die inhibitorischen Moleküle aus dem Blutplasma oder direkt aus den umgebenden Zellen, spielen hierbei eine entscheidende Rolle zur Beendigung der Entzündung und für die Geweberegeneration.

### **Neutrophile Elastase**

Die neutrophile Elastase gehört zu der Gruppe der Chymotrypsin – Superfamilie der Serinproteasen. Sie wird hauptsächlich in neutrophilen Granulozyten produziert, wo

sie intrazellulär nach Prozessierung durch Cathepsin C (Korkmaz et al. 2008) in azurophilen Granula gespeichert wird. Auch Mastzellen und Monozyten exprimieren die neutrophile Elastase (Fitch et al. 2006).

Intrazellulär ist sie hauptverantwortlich für den phagosomalen Abbau der aufgenommenen Mikroorganismen. Bei überschießender Aktivierung der PMNL wird die NE in den Extrazellularraum abgegeben, wo sie Proteine der Extrazellulärmatrix spaltet und Bakterien direkt schädigen kann (Ujiie et al. 2007, Fitch et al. 2006).

Dieses erfolgt durch Spaltung von Oberflächenproteinen (OmpA) gramnegativer Bakterien oder ihrer Virulenzfaktoren (Korkmaz et al. 2008, Pham 2008).

Die extrazellulär freigesetzte neutrophile Elastase ist über multiple Regulationsmechanismen in der Lage das Entzündungsgeschehen und die Immunantwort zu modulieren.

Die NE stimuliert über proteolytische Modifizierung die Freisetzung und Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wie  $\text{TNF-}\alpha$ , (Korkmaz et al. 2008, Shaw und Wiedow 2011) und des Monozyten anlockenden Proteins-1 (MCP-1) in gingivalen Fibroblasten (Uehara et al. 2003) und spaltet IL-6, IL-18 und den Komplementfaktor C5 (Pham 2008).

Sie spaltet membrangebundenes  $\text{TGF-}\alpha$  und  $\text{TGF-}\beta$  (Pham 2008). Die Bindung des löslichen  $\text{TGF-}\alpha$  an den EGFR (epidermal growth factor receptor) führt zur einer mizinen Hypersekretion oder Proliferation von Keratinozyten (Shao und Nadel 2005).

CD14, ein wichtiger Oberflächenrezeptor für bakterielles LPS wird durch die neutrophile Elastase, zeit- und konzentrationsabhängig gespalten. Dieses führt über die Reduktion der IL-8 Produktion in einen negativen Feedbackmechanismus zu einer verringerten Immunantwort (Pham 2008).

Über ihre Kaspase-ähnliche Aktivität ist die NE befähigt die Apoptose von Zellen zu induzieren (Korkmaz et al. 2008).

### **Proteinase 3**

Die Proteinase 3 ist eine 29kDA große chymotrypsin-ähnliche Serinprotease mit großer Homologie zur neutrophilen Elastase und wird hauptsächlich nach Prozessierung durch Cathepsin C in den azurophilen Granula der PMNL gespeichert (Korkmaz et al. 2008). Auch Monozyten, basophile Granulozyten und Mastzellen sind in der Lage PR3 zu produzieren (Uehara et al. 2003).

Der intrazelluläre Abbau der phagozytierten Mikroorganismen ist die Hauptfunktion der Proteinase 3. Eine Aktivierung der PMNL führt zur einer vermehrten Ausschleusung und Anbindung der PR 3 an deren Zelloberfläche. Dort trägt diese zur proteolytischen Spaltung extrazellulärer Matrixproteine bei und aktiviert die Zytokine  $\text{TNF-}\alpha$  und  $\text{IL-1}\beta$  in Monozyten (Korkmaz et al. 2008)

Die Proteinase 3 ist in der Lage, die IL-8, IL-18, IL-32 (Pham 2008) und MCP-1 – Freisetzung, sowie die ICAM-1 Expression in gingivalen Fibroblasten zu stimulieren (Uehara et al. 2002, Uehara et al. 2003). Damit wird die Migration von PMNL und T-Lymphozyten in das Entzündungsgebiet vorangetrieben und die Entzündungsantwort auch des erworbenen Immunsystems über Th-1- und Th-2-Zellen moduliert (Uehara et al. 2003).

Durch spezifische Aktivierung von oberflächengebundenen Integrinen und Protease –aktivierten Rezeptoren (PARs) (Uehara et al. 2002, Uehara et al. 2003) beeinflusst die PR3 auch Zell-Zell- und Zell-Extrazellulärmatrix-Interaktionen und vermittelt sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Effekte (Pham 2008).

Die Proteinase 3 ist nach Freisetzung aus intrazellulären, sekretorischen Granula hauptsächlich verantwortlich für die extrazelluläre Prozessierung des Cathelicidins hCAP-18 in das aktive antimikrobielle Peptid LL-37 (Gallo et al. 2002, de Haar et al. 2006, Puklo et al. 2008).

Damit sind die extrazellulär freigesetzten neutrophilen Serinproteasen neben dem Abbau von extrazellulären Matrixproteinen über proteolytische Modulation von Chemokinen und Cytokinen entscheidend an Initiation und Aufrechterhaltung der Entzündungsantwort beteiligt und durch Aktivierung von Lymphozyten auch zur Regulation der Immunantwort befähigt (Fitch et al. 2006, Pham 2008, Shaw und Wiedow 2011).

### **Sekretorischer Leukozyten Proteaseinhibitor (SLPI)**

Der sekretorische Leukozyten Proteaseinhibitor ist ein 11,7 kDa großes kationisches, nicht-glykolysiertes Protein mit 2 ähnlichen WAP (whey acidic protein)-Domänen (Williams et al. 2006).

SLPI wird in den das Entzündungsgebiet umgebenden Epithelzellen, Makrophagen und PMNL (Jin et al. 1998) produziert und wirkt hauptsächlich inhibitorisch auf die neutrophile Elastase. Eine konstitutive Expression von SLPI in niedrigen

Konzentrationen scheint eine basale Schutzfunktion für das Gewebe gegenüber Proteasen zu übernehmen. Die Expression kann im Bedarfsfall bei auftretenden inflammatorischen Reizen erhöht werden (Williams et al. 2006).

Lipopolysaccharide, die pro-inflammatorischen Zytokine  $\text{TNF-}\alpha$  und IL-1, als auch die anti-inflammatorischen Zytokine IL-6, IL-10 und die neutrophile Elastase wirken aktivierend auf die Expression von SLPI (Jin et al 1998).

Die Proteinasen Cathepsin B, S und L sind in der Lage SLPI zu spalten (Roghianian et al. 2006, Williams et al. 2006).

Aufgrund seiner kationischen Ladung kann SLPI bakterielle Zellmembranen schädigen (Fitch et al. 2006) und wirkt so direkt antimikrobiell.

Durch Hemmung der neutrophilen Phagozytose und des oxidativen Bursts, sowie Stimulierung der Beseitigung apoptotischer Zellen und der Freisetzung der anti-inflammatorischer Zytokine  $\text{TGF-}\beta$  und IL-10 aus Makrophagen (Williams et al. 2006) wirkt SLPI auch anti-inflammatorisch und spielt auch bei der Entzündungsauflösung und Geweberegeneration eine wichtige Rolle (Into et al. 2014).

Über modulierende Einflüsse auf die  $\text{PGE}_2$  –Sekretion von Monozyten und die LPS-getriggerte Makrophagenaktivierung übt SLPI Effekte auf der erworbene Immunantwort aus und begünstigt die Präsenz von Th-1-Zellen (Fitch et al. 2006, Roghanian et al. 2006).

## **Elafin**

Elafin ist ein 9,9 kDa großes körpereigenes Protein mit 2 Domänen, einem C-Terminus mit WAP-Domäne, welche die Proteaseninhibitions-Domäne darstellt und einer N-terminalen Cementoin-Domäne, die für die Bindung an Proteine der Extrazellulärmatrix verantwortlich ist (Zani et al. 2004).

Elafin wird in Epithelzellen produziert und ist in der Lage, durch seine inhibitorische C-Domäne spezifisch die gewebedestruierende und proinflammatorische Wirkung der neutrophilen Elastase und der Proteinase 3 potent zu inaktivieren und damit schützend den Entzündungsprozess zu modulieren (Pfundt et al. 1996, Guyot et al. 2005, Williams et al. 2006).

Es wirkt inaktivierend auf die endogene Gefäßelastase (EVE) und kann so eine EVE getriggerte, entzündlichen Gefäßwandverdickung mit Reduktion des Blutflusses, Blutdruckerhöhung und ggf. resultierender Gewebenekrose verhindern (Shaw und Wiedow 2011).



Inflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-1, aber auch LPS und die neutrophile Elastase induzieren die Expression von Elafin in lokalen Keratinozyten (Zani et al. 2004, Williams et al. 2006).

Auch eine antimikrobielle Funktion konnte für Elafin nachgewiesen werden. Elafin wirkt wahrscheinlich durch seine hohe negative Ladung direkt zellmembranschädigend auf Bakterien. Außerdem bindet es LPS und unterdrückt damit sowohl die Monozytenaktivierung über MCP-1 als auch die Produktion des proinflammatorischen Zytokins TNF- $\alpha$  (Fitch et al. 2006, Shaw und Wiedow 2011). Des Weiteren wird auch Elafin eine Rolle bei der Entzündungsauflösung durch Begünstigung der Beseitigung apoptotischer Leukozyten durch Makrophagen (Guzik und Potempa 2008) und der Gewebedifferenzierung bei Wundheilungsprozessen (Fitch et al. 2006) eingeräumt.

Auch Elafin beeinflusst die erworbene Immunantwort und führt zur Ausbildung einer Th-1 dominierten Antwort (Roghani et al. 2006, Fitch et al. 2006).

Aufgrund verschiedener Molekülgrößen wird zwischen dem Vorläufermolekül Pro-elafin oder Trappin-2 (9,9kDa) und seiner löslichen Form Elafin (6kDa) ohne Cementoin-Domäne taxonomisch unterschieden (Williams et al. 2006).

Elafin und SLPI sind wichtige Moleküle in der Regulationskontrolle der durch neutrophile Granulzyten dominierten angeborenen Entzündungsantwort und verhindern eine übermäßige Gewebeschädigung durch exzessive Proteolyse und können so die epitheliale Integrität bewahren (Pfundt et al. 1996). Gleichzeitig fördern sie die Einbindung der erworbenen Immunantwort auf das Entzündungsgeschehen, durch Stimulation der einer Th1-Antwort (Williams et al. 2006). Therapeutische Ansätze mit über Aerosol verabreichtem, rekombinantem Elafin/Trappin-2 (Zani et al. 2004) zur Regulation der Immunantwort in entzündlichen Lungenerkrankungen erscheinen über einer deutliche Reduktion der PMNL-Infiltration und Gewebedestruktion erfolversprechend (Williams et al. 2006).

## **2.4 Wirkung von *P. gingivalis* auf neutrophile Serinproteasen und ihre Inhibitoren**

*P. gingivalis* kann durch verschiedene Mechanismen die Aktivität der neutrophilen Serinproteasen und ihrer Inhibitoren beeinflussen.

So spaltet *P. gingivalis* mittels der Protease Periodontain den  $\alpha$ 1-Proteinase Inhibitor (Nelson et al. 1999), der die Aktivität der neutrophilen Elastase und der Proteinase 3 reguliert und so zu einem unkontrolliertem Abbau von Kollagen, Elastin und der Proteoglykane im Zahnhalteapparat führt (Travis et al. 1994, Potempa und Pike 2009, Guyot et al. 2010).

Die argininspezifischen Gingipaine RgpA und RgpB spalten die neutrophile Serinprotease Cathepsin G und SLPI (Into et al. 2006).

Somit werden deren Protease-inhibierenden und anti-inflammatorischen Effekte aufgehoben und *P. gingivalis* verschafft sich einen Selektionsvorteil gegenüber der Immunantwort durch Entkopplung der entzündlichen Regulationsmechanismen (Into et al. 2006).

Neben SLPI können RgpA, RgpB und Kgp auch Elafin, den epithelialen Inhibitor der neutrophilen Serinproteasen in vitro inaktivieren bzw. spalten und greifen damit direkt in die Regulation der PMNL-getragenen Entzündungsantwort ein (Kantyka et al. 2009).

Dadurch werden die anti-inflammatorischen, antibakteriellen und gewebeproliferativen Einflüsse von Elafin aufgehoben und das Protease-Proteaseinhibitor Gleichgewicht zu Gunsten der proteolytischen Funktion verschoben.

### **3 Zielstellung**

In vorangegangenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass *P. gingivalis* die Proteaseinhibitoren SLPI und Elafin spalten kann.

Dieser Ansatz lässt die Hypothese erwachsen, dass Infektionen mit *P. gingivalis* einen gegenläufigen Effekt auf die Konzentration der Protease-Inhibitoren im entzündeten gingivalen Gewebe ausüben und seine Gingipaine die regulativen Homöostaseprozesse empfindlich stören, welches in einer übermäßigen Aufrechterhaltung der Entzündungsantwort und der damit verbundenen verstärkten Gewebedestruktion resultiert.

Die Zielstellung dieser Pilot-Studie war es daher, die Korrelation zwischen dem Vorkommen von *P. gingivalis* in der subgingivalen Plaque, der daraus resultierenden arginin-spezifischen Gingipainaktivität und den Konzentrationen von Elafin und SLPI anhand von Sulkusflüssigkeitsproben, die von Patienten mit Gingivitis und Parodontitis gewonnen wurden, zu ermitteln.

Um mögliche Zusammenhänge zwischen der Konzentration der Protease-Inhibitoren und deren Wirkung auf die Serinproteasenaktivität aufzuzeigen, wurden außerdem die Enzymaktivitäten der neutrophilen Elastase und der Proteinase 3 bestimmt.

## **4 Material und Methoden**

### **4.1 Studienteilnehmer**

Die Studienteilnehmer wurden aus dem Patientenpool der Poliklinik für Konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Universitätsklinik Jena rekrutiert. Ausschlusskriterien für die Studienteilnahme waren systemische Erkrankungen wie z.B. koronare Herzkrankheit, Diabetes mellitus oder ein Krebsleiden. Außerdem wurden Patienten, die innerhalb der letzten 6 Monate vor Datenerhebung Antibiotika erhalten hatten sowie Frauen in Schwangerschaft und Stillzeit nicht mit einbezogen.

Von jedem der insgesamt 31 Patienten wurden die demografischen Daten: Alter und Geschlecht ermittelt und im Rahmen eines zahnärztlichen und parodontalen Befundes die Zahnzahl, die Sondierungstiefen aller Zähne mittels einer 6-Punktmessung und der BoP bestimmt und dokumentiert.

Zur Gewinnung der Sulkusflüssigkeit wurde eine Sulkuswaschung an der jeweils größten Sondierungstiefe eines jeden Quadranten durchgeführt.

Anschließend wurden die Studienteilnehmer entsprechend ihres Krankheitsbildes in vier Gruppen unterteilt, parodontal gesunde Patienten (gesund), Patienten mit Gingivitis (Gingivitis), chronischer Parodontitis (CP) und aggressiver Parodontitis (AP).

Die Einteilung der Krankheitsbilder in chronische und aggressive Parodontitis erfolgte nach der Klassifizierung der Parodontalerkrankung, die 1999 im „International Workshop for a Classification System of Periodontal Diseases and Conditions“ festgelegt wurde (Armitage 1999).

Die Durchführung der Studie erfolgte gemäß der 6. Revision der Deklaration von Helsinki von 2008 und nach Zustimmung der Ethikkommission der Universität Jena. Jeder Proband erklärte vor Studienbeginn schriftlich sein Einverständnis zur Teilnahme an der Studie.

## **4.2 Gewinnung der Sulkusflüssigkeit**

Die Probenentnahme der Sulkusflüssigkeit erfolgte immer vormittags, ca. 2- 3 Stunden nach Einnahme des Frühstücks. Dabei wurde die Sulkusflüssigkeit durch ein Auswaschen an der jeweils größten Sondierungstiefe eines jeden Quadranten entnommen. Zuvor wurde die entsprechende Region durch Anwendung eines Luftbläfers leicht getrocknet und durch Watterollen vor einer akzidentellen Speichelkontamination geschützt.

Für das Auswaschen wurde eine mit 10µl 0,9%iger NaCl-Lösung befüllte Mikropipettenspitze vorsichtig in Sulkus eingeführt und ungefähr 1 mm unterhalb des Gingivalrandes platziert (Sigusch et al. 1992, Guentsch et al. 2011).

Es erfolgte dann die dreimalige Applikation und Wiederaufnahme von 10µl 0,9%iger NaCl-Lösung in den Sulkus. Die so gewonnene Sulkusflüssigkeit eines jeden Patienten (insgesamt ca. 120µl), wurde in einem Eppendorfgefäß gesammelt und bis zur Analyse der Proben tiefgekühlt bei -20°C gelagert.

## **4.3 Bestimmung der Enzymaktivitäten von neutrophiler Elastase und Proteinase 3**

### **4.3.1 Neutrophile Elastase**

Die Enzymaktivität der neutrophilen Elastase wurde mit Hilfe einer chromogenen Substanz ermittelt. Als Substrat diente N-Methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-*p*-Nitroanilid (MeoSuc-AAPV-*p*NA) (Sigma, München), aus dem die Freisetzung von *p*-Nitroanilid nach enzymatischer Spaltung bestimmt wurde.

Die Analyse erfolgte in Mikrotiterplatten. Pro Well wurden 10µl Sulkusflüssigkeit zu 140µl einer vorab hergestellten Substratlösung pipettiert. Die Substratlösung enthielt 0,75 mM (Endkonzentration) Substrat (N-MeoSuc-AAPV-*p*NA) in 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,5). Das Gesamtreaktionsvolumen beträgt 150µl.

Die bei der enzymatischen Spaltung freigewordene Menge von *p*-NA führt aufgrund eines konzentrationsabhängigen gelblichen Farbumschlages zu einer Abschwächung der Strahlung nach Durchqueren der Lösung.

Diese Absorptionsänderung der kompletten Mikrotiterplatte wurde im Spektrometer Spectromax 250 (Molecular Device Corp., Sunnyvale, USA) bei einer Wellenlänge von  $\lambda=405\text{nm}$  über einen Zeitraum von 30 min kontinuierlich gemessen. Die Einheiten für die Aktivität der Neutrophilen Elastase entsprachen dem Anstieg der Absorption pro Minute.

### 4.3.2 Proteinase 3

Die Aktivität der Serinprotease Proteinase 3 wurde mittels des Substrates 2-Aminobenzoyl-Gly-Val-Ala-Asp-NortValine-Ala-Asp-Tyr-Gln-Lys(2,4-Dinitrophenyl)-Asp-amide (Abz-GVADnVADYQ-Y(NO<sub>2</sub>)-D, (zur Verfügung gestellt von Jan Potempa) ermittelt.

Für die Analyse wurden wiederum 10 µl der gewonnenen Sulkusflüssigkeit zu 140µl einer vorab hergestellten Substratlösung gegeben. Die Substratpufferlösung lag in einer abschließenden Konzentration von 50µM Substrat (GVADnVADYQ-Y(NO<sub>2</sub>)-D) in 0,1 M Tris-HCl, 5 mM EDTA, 0,15 M NaCl sowie 0,05% Tween-20,5% Dimethylformid (pH 7,5) vor.

Die Messung der Proteaseaktivität erfolgte mittels eines Spectramax GEMINI XS (Molecular Device Corp., Sunnyvale, USA). Hierbei wurde der bei der Substrathydrolyse entstehende Fluoreszenzanstieg in dem Wellenlängenbereich  $\lambda_{\text{ex}} = 320\text{nm}$  bis  $\lambda_{\text{em}} = 420\text{nm}$  über 3 Stunden bei 37°C detektiert. Die Aktivität der Proteinase 3 wurde in relativem Fluoreszenzanstieg pro Minute ausgedrückt.

## 4.4 Mikrobiologischer Nachweis des parodontopathogenen Keimspektrums

### 4.4.1 Vorbereitung: DNA-Extraktion aus der Sulkusflüssigkeit

Zunächst wurde die DNA aus 5 µl der gewonnenen Sulkusflüssigkeit isoliert. Dafür wurde ein universeller DNA-Extraktionskit ( Genomic Mini, A&A Biotechnology, Gdynia, Poland) entsprechend den Herstellerangaben angewendet.

### Isolationsprinzip

Die DNA Extraktion aus dem Untersuchungsmaterial erfolgt durch Lyse der im Probenmaterial enthaltenen Zell- und Gewebsanteile und Denaturierung der darin enthaltenen DNA durch Proteinase K und chaotrophische Salze.

In einem weiteren Schritt werden nun DNA und die gelösten Zellbestandteile voneinander getrennt.

Dabei macht sich der Test die Eigenschaft zu Nutze, dass die herausgelösten, denaturierten DNA-Fragmente sich in mit chaotrophen Salzen gesättigten Lösungen an Siliziumdioxidoberflächen (Filter) anlagern, Die gelösten Zellen- oder Gewebeanteile passieren den Glasfasermatrixfilter jedoch ohne weitere Bindung.

### **Probenvorbereitung**

In jedes Probenröhrchen wurden 5 µl Sulkusflüssigkeit und 100 µl Tris-Buffer(10 mM TrisHCl pH 8,5) pipettiert, für 30s gevortext und kurzzeitig anzentrifugiert. Danach wurden 200µl Total-Lysis Puffer und 20µl Proteinase K aus dem Testkit entnommen, zu jedem Probenröhrchen hinzugefügt, die Proben gevortext (20s). Abschließend erfolgte dann eine Inkubation für 20 min bei 37°C und für 5 min bei 70°C.

### **DNA-Isolation**

Die Probenröhrchen wurden für 2 min bei 14'000 U/min zentrifugiert. Der entstandene Durchfluss wurde in dem Auffanggefäß des Filter-Tube gesammelt. Nach nochmaliger Zentrifugation (1 min bei 14'000 U/min) wurde erneut der Durchfluss verworfen und das Filter-Tube wieder in das Auffanggefäß eingesetzt und 500 µl Washpuffer A1 hinzupipettiert und erneut zentrifugiert ( 2 min bei 14'000U/min).

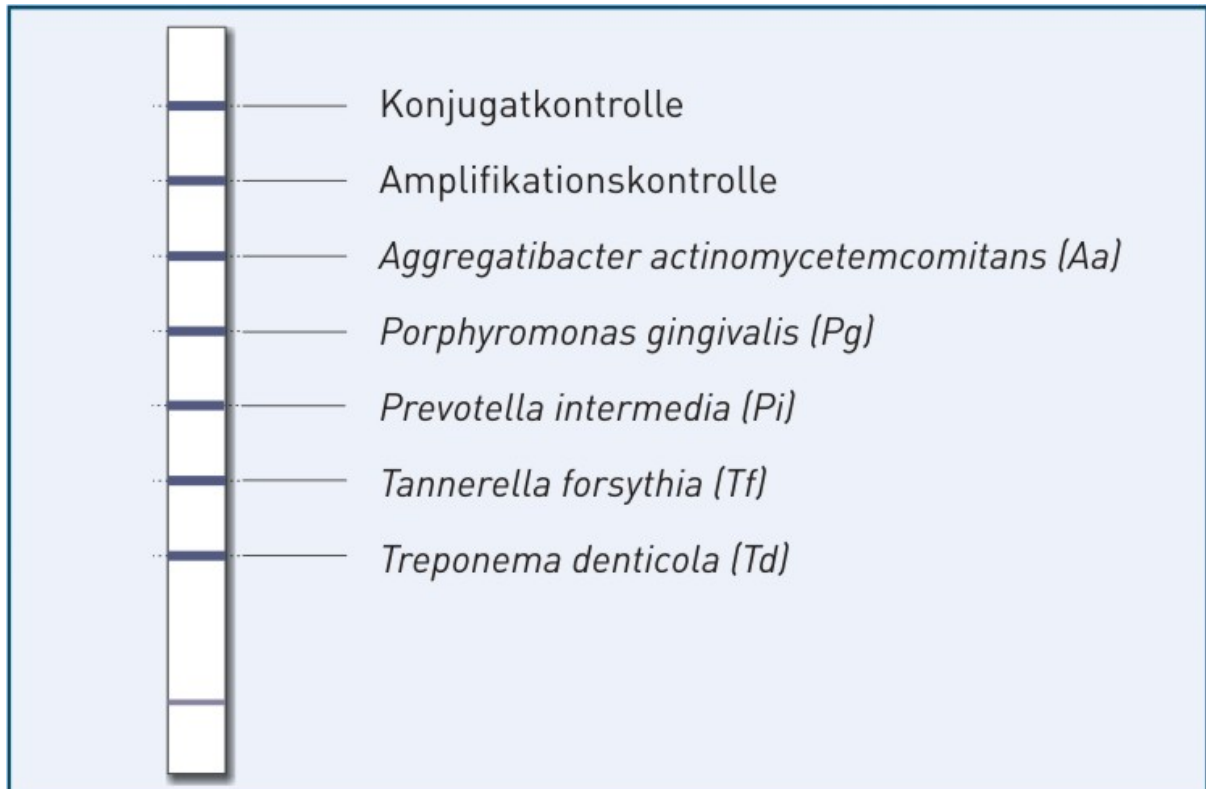
Um die DNA herauszulösen, wurde das Auffanggefäß verworfen, das Filter-Tube in ein sauberes 1,5ml Eppendorf-Tube eingesetzt und 100 µl Tris-Buffer ( vorgewärmt auf 75°C) zugefügt.

Nach 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und nochmaliger Zentrifugation (1 min bei 14'000U/min) wurde das Filter-Tube verworfen und das die isolierte DNA-enthaltende Reaktionsgefäß verschlossen.

Die gewonnene DNA wurde für das DNA-Strip-Verfahren und für die real-time PCR eingesetzt.

#### **4.4.2 DNA-Strip zur Bestimmung der vorhandenen parodontalpathogenen Bakterien**

Die Bestimmung der vorhandenen parodontalpathogenen Erreger erfolgte mittels DNA-Strip-Technologie micro-IDent®96 (Hain Lifescience, Nehren, Germany) nach Herstellerangaben. Dieser Test ermöglicht den Nachweis für die fünf am häufigsten vorkommenden Bakterienspezies, die am signifikantesten die parodontale Gewebedestruktion und inflammatorische Abwehrreaktion beeinflussen (S. 39, Abb.1).



**Abbildung 1:** micro-IDent® Teststreifen der Fa. Hain Lifescience gibt Auskunft über Vorkommen und Konzentration von 5 parodontopathogenen Spezies

Nachweisbare Bakterienspezies:

- *A. actinomycetemcomitans*
- *P. gingivalis*
- *P. intermedia*
- *T. forsythia*
- *T. denticola*

Zur Vervielfältigung der zuvor isolierten DNA wurde zunächst eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mittels des, von Hain Life Science, im Kit mitgelieferten Primer-Nukleotid-Mixes durchgeführt.

Zuerst wurde der benötigte Master-Mix für die benötigte Probenanzahl (+10% Pipettierverlust) hergestellt. Dafür wurden in jede Probe 17,5 µl Primer-Nukleotid-Mischung (micro-IDent®), 2,5 µl 10x PCR-Puffer, 2,5 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub> und 1 U thermostabile DNA-Polymerase (Fermentas Life Science, St. Leon-Rot, Germany) zugegeben. Anschließend wurde zu jeder Probe noch 2,5 µl der zuvor isolierten Sulkusflüssigkeits-DNA hinzupipettiert.

Die 25 µl Gesamtvolumen der Reaktionslösung, die der PCR zugeführt wurden, bestanden aus 2,5 µl isolierter DNA als Kopiervorlage und 22,5 µl Master Mix.



Die PCR wurde automatisch in einem Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) durchgeführt.

Zuerst erfolgte die initiale Denaturierung der enthaltenen DNA bei 95°C über einen Zeitraum von 5 min.

Zur Amplifikation folgten 10 Zyklen mit Temperaturwechseln für 30 s bei 95°C f und 2 min bei 60°C und 20 Zyklen mit Temperaturwechseln für 10 s bei 95°C sowie für jeweils 30 s bei 55°C und bei 72°C. Abschließend wurde das Reaktionsgemisch konstant für 10 min bei 72°C inkubiert.

Die anschließende reverse Hybridisierung erfolgte ebenfalls nach Herstellerangaben. Dazu wurden die DNA-Amplifikate denaturiert und bei 45°C mit dem Hybridisierungspuffer und den mit RNA-Sonden der jeweiligen Bakterienspezies beschichteten Test-Streifen für 30 min inkubiert.

Nach Bindung der PCR-Bruchstücke mit ihren jeweiligen Komplementärbanden auf dem Teststreifen wurde durch Waschen, jegliche unspezifisch gebundene DNA entfernt.

Zur Visualisierung der Hybridisierungsergebnisse wurde mit Streptavidin konjugierte alkalische Phosphatase hinzugefügt. Diese wurde nach erneutem Waschen mit ihrem Substrat aktiviert und die jeweiligen Reaktionsbanden wurden sichtbar. Die Auswertungstreifen besitzen zwei Kontrolllinien und 5 speziesspezifische Banden. Eine Kontrollbande dient als Amplifikationskontrolle und die andere zur Kontrolle des Hybridisierungsvorganges.

Abschließend wurden die Teststreifen auf den micro-IDent Auswertungsbögen festgeklebt und die Bandenintensität bestimmt (Eick et al. 2011).

Zur quantitativen Analyse wurden die Teststreifen mit Adobe Photoshop Elements 9 (Adobe Systems, San Jose, CA) eingescannt und der Kontrast mittels Autokontrast angepasst. Danach wurde die Farbintensität jeder Bande in Relation zur Intensität des weißen Untergrundes und der Konjugatkontrolle des Teststreifens prozentual ins Verhältnis gesetzt.

#### **4.4.3 Realtime-PCR zur Bestimmung der Keimzahlen von *P.gingivalis***

Zusätzlich wurde die Real-time PCR genutzt um die Menge der vorhandenen *P.gingivalis* – Keimzahlen zu bestimmen. Dabei wurde der von Ashimoto (Ashimoto et al. 1996) beschriebene Primer, der GoTaq® qPCR Master Mix (Promega AG, Dübendorf, Switzerland) zu der DNA gegeben. Die Amplifikation und Auswertung erfolgt mittels 7500 Real time PCR System (Applied Biosystem-Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Als Positivkontrolle diente der *P. gingivalis*–Stamm ATCC 33277 mit  $10^2$ - $10^7$  Zellen pro Probe.

#### **4.5 Enzymaktivität der Arginin-spezifischen Gingipaine (Rgp)**

Die Enzymaktivität der Gingipaine RgpA und RgpB in der Sulkusflüssigkeit wurde mittels des chromogenen Substrates N-Benzoyl-L-Arginine-*p*-Nitroanilide (BAPNA) (Sigma, St. Louis, MO, USA).

Dafür wurden in jedes Well einer Mikrotiterplatte 2,5 µl einer jeden Sulkusflüssigkeitsprobe in 47,5 µl HEPES-Pufferlösung mit 10 mM L-Cystein gelöst und für 5 Minuten bei 37°C präinkubiert.

Das vorhandene L-Cystein wurde zuvor mit Na(OH) neutralisiert. Danach erfolgte die Zugabe von 100 µl Substratpufferlösung zu einem Gesamtreaktionsvolumen von 150 µl.

Die Substratpufferlösung enthielt 0,75µl BAPNA 0,5mM, 6,75 µl DMSO und 92,5 µl Tris-HCl 50mM mit 10 mM L-Cystein ,pH 7,5.

Für die Positivkontrollen wurden in jedes Well der Mikrotiterpalte 3,0 µl einer Lösung aus 50 mM RgpA bzw. RgpB, TNCT-Puffer mit 10 mM L-Cystein gegeben. Zuvor wurden die Cysteinproteasen für 15 min bei 37 ° C mit dem TNCT-Puffer mit 10mM L-Cystein aktiviert.

Danach erfolgte auch bei den Postivkontrollen die Zugabe von 47 µl HEPES-Puffer mit 10mM L-Cystein und 100 µl der oben beschriebenen Substratpufferlösung.

Für jede Sulkusflüssigkeitsprobe wurden doppelte Versuchsreihen durchgeführt.

Die Messung der amidolytischen Aktivität erfolgte direkt nach Hinzufügen der Substratpufferlösung zu dem Untersuchungsmaterial

Die spektrofotometrische Messung der Freisetzung von *p*-Nitroanilid wurde durch die Absorptionsänderung der kompletten Mikrotiterplatte im Spektrometer Spectromax 250 (Molecular Device Corp., Sunnyvale, USA) bei einer Wellenlänge von  $\lambda=405\text{nm}$  kontinuierlich über einen Zeitraum von 60 min durchgeführt.

#### **4.6 Bestimmung der Protease-Inhibitoren SLPI und Elafin**

##### **4.6.1 Secretory leukocyte protease inhibitor**

Die Menge des SLPI in der gewonnenen Sulkusflüssigkeit wurden mit Hilfe eines ELISA Test-Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) bestimmt. Die Sulkusflüssigkeit wurde 1:100 mit Probenpuffer verdünnt in die Mikrotiterplatte appliziert und anschliessend wurde nach Herstellerangaben vorgegangen. Die Nachweisgrenze des Kits lag bei 100 pg/ml.

##### **4.6.2 Elafin**

Der Nachweis von Elafin wurde mit Hilfe eines Western Blots durchgeführt. Beim Western Blot werden die Proteine nach elektrophoretischer Auftrennung in einem Gel an ihrer darauf befindlichen Position, auf einer stabilen Membran fixiert und anschließend durch spezifische Antikörper nachgewiesen.

Zur Vorbereitung der Proben für die darauf folgende Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden 3  $\mu\text{l}$  einer jeden Sulkusflüssigkeit zunächst mit einem Tricine-Sample-Buffer 2X (0,125M Tris-HCl, pH 6,8, 20% Glycerol, 4% SDS, 5% Mercaptoethanol) zu einer Gesamtmenge von 24  $\mu\text{l}$  verdünnt. Als Positivkontrolle wurde 1  $\mu\text{l}$  Elafin (50 ng) mit dem oben beschriebenen Tricine-Sample-Buffer 2X ebenfalls zu einer Gesamtmenge von 24  $\mu\text{l}$  verdünnt.

Zur Gelvorbereitung wurden zwei rechteckige Glasplatten mit einem Abstandshalter in einen Ständer eingespannt.

Anschließend wurde die Trenngellösung aus 15% Acrylamid- und Bisacrylamid-Monomere sowie 3M Tris-HCl, pH 8,45 und 0,3% SDS hergestellt. Nach Hinzufügen von 70  $\mu\text{l}$  APS (Polymerisationsinitiator) und 7  $\mu\text{l}$  TEMED (Polymerisationskatalysator) wurde die Mischung in ungefähr  $\frac{3}{4}$  des Spaltraumes zwischen den Glasplatten gefüllt und mit Isopropanol zur Ausbildung einer geraden

Kante und Inhibitionsschicht übergossen. Dieses erste Gel dient als eigentliches Trenngel für die Proteinbanden.

Nach der Polymerisation des ersten Gels wurde die zweite Gellösung mit 4% Polyacrylamid, 3M Tris-HCl, pH 8,45 und 0,3% SDS hergestellt. Wieder wurden 70 µl APS und 7 µl TEMED zur Reaktionsinitiation hinzugefügt und die Lösung zwischen die Glasplatten eingefüllt und ein Plastikkamm am oberen Ende der Glasplatten eingelegt. Dieses Gel dient als Abstandshalter zwischen dem Untersuchungsmaterial und dem Trenngel sowie als Organisationszone der in den Proben enthaltenen Proteine, damit eine bereits geordnete Formation der Proteine das Trenngel erreicht. Nach der Polymerisation konnte der Kamm entfernt werden, wodurch die Vertiefungen zur Aufnahme der Sulkusflüssigkeitsproben entstanden. Die vorbereiteten Probenlösungen wurden nun in die Vertiefungen eingebracht.

Proteine enthalten sowohl saure Carboxyl- als auch basische Aminogruppen. Diese bestimmen auch ihre positive oder negative Gesamtladung. Deshalb wird die Auftrennung der Proteine in der Gelelektrophorese sowohl durch den pH-Wert der sie umgebenden Lösung, als auch durch die Anzahl der vorhandenen Carboxyl- und Aminogruppen bestimmt. Die Anodenpuffer 2X (0,2M Tris, pH 8,8) und Kathodenpuffer 2X (0,1M Tris-Tricine, pH 8,25 und 0,1% SDS) wurden hergestellt. Die mit den jeweils 8 Proben, einer Elafin - Positivkontrolle und einem Molekülmarker (SeeBlue Plus2, Invitrogen, Hamburg) für das Molekulargewicht beladenen Polyacrylamidgele wurden dann vertikal zwischen dem Anoden- und Kathodentank in einem MiniVE Vertical Electrophoreses System (GE Healthcare) eingespannt und die Puffer eingefüllt.

### **Gelelektrophorese**

Die anschließende Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, 15% Acrylamid), wurde in einem Tris - Tricine diskontinuierlichen Puffersystem für 15 min bei 80V und für 15 min bei 120V durchgeführt.

Das diskontinuierliche Puffersystem, bei dem sowohl zwei verschiedene Gel-Pufferlösungen, als auch unterschiedliche Anoden- und Kathodenpufferlösungen verwendet werden, um eine verbesserte Auftrennung der Proteine zu erreichen. Der eingesetzte TRIS-Tricine-Puffer ermöglicht eine Auftrennung auch sehr kleiner Peptide mit einem Molekulargewicht unter 10.000 Da.

### **Semi-Dry Blot**

Die mit den Proteinen beladenen Gele wurden zusammen mit einer aktivierten PVDF-Membran (Millipore, Schwalbach) in den Transfer-Buffer (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 20% Methanol, pH 8,3) für 10 min bei 4°C im Kühlraum inkubiert. Durch diesen Schritt wurde alles überschüssige SDS entfernt, welches für die Proteinbindung an der Membran nachteilig wäre. Beim nachfolgend durchgeführten Elektrotransfer in einem Semi-Dry-Blot wurden das Gel in direktem Kontakt mit der PVDF-Membran gebracht und sowohl ober- als auch unterhalb mit jeweils vier Lagen Filterpapier bedeckt. Alles wurde nun zwischen Anode und Kathode eingespannt und für 30 min bei 20 V einem elektrischen Feld ausgesetzt. Die in der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden hierbei durch ein senkrecht zum Gel gerichtetes elektrisches Feld auf die Membran übertragen. Nach Abschluss des Elektrotransfers waren die in der Markerbande dargestellten eingefärbten Molekülbanden auf die PVDF-Membran übertragen. Dies diente als optische Kontrolle für den erfolgreichen Durchlauf des Elektrotransfers aller Proteine.

### **Antikörperkopplung**

Im nächsten Schritt wurden zuerst die noch freien unspezifischen Proteinbindungsstellen auf den Membranen geblockt. Dazu wurden die PVDF - Membranen über Nacht mit 50 ml einer 2%-igen bovinen Serumalbumin Tris-HCl gepufferten Salzlösung mit 0,05% Tween 20 (TTBS) bei 4°C inkubiert. Das Albumin geht einen physikalischen Verbund mit der Membranoberfläche ein, beeinträchtigt die gebundenen Proteine jedoch nicht.

Am nächsten Morgen erfolgte die Inkubation mit dem elafin-spezifischen, monoklonalem Antikörper (biotinisierter anti-humaner Trappin-2 von Ziegen, (BAF-1747; R&D, Wiesbaden-Nordenstedt; verdünnt 1:500 in 2% BSA-TTBS) für 60 min bei Raumtemperatur. Der Antikörper bindet spezifisch an das Zielprotein Elafin auf der Membranoberfläche.

Die inkubierte PVDF-Membran wurde dann zur Entfernung aller ungebundenen Elafin-Antikörper 4-mal für jeweils 10 min mit TTBS gewaschen.

Danach erfolgte Inkubation mit dem sekundären polyklonalen Antikörper Streptavidin-HRP (horseradish peroxidase) (1:20'000; RPN-1231; GE Healthcare, München) für 60 min bei Raumtemperatur. Dieser sekundäre Antikörper bindet sich

unspezifisch an den primären Antikörper Trappin-2 und ist über Streptavidin mit der Meerettichperoxidase konjugiert.

Es erfolgte ein erneutes vierfaches Waschen mit TTBS für jeweils 10 min zur Beseitigung jeglicher nicht gebundener sekundärer Antikörper, welche die spätere Ergebnisdarstellung verfälschen könnten.

Anschließend wurde das Substrat ECL + (GE Healthcare) entsprechend den Herstellerangaben zu gleichen Teilen aus zwei Einzelkomponenten hergestellt und 3ml des fertigen Substrates zur Reaktion mit der Streptavidin-HRP auf die Membranen gegeben.

Das Substrat ECL+(enhanced Chemiluminescence) enthält den chemilumineszenten Farbstoff Luminol und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) als Ausgangsstoff für die Meerettichperoxidase, die bei der enzymatischen Spaltung freierwerdenden Protonen oxidieren in einem mehrstufigen Prozess das vorher fast farblose Chromogen Luminol zu seinem farbigen Endprodukt unter Bildung von Wasser und Stickstoff.

Das in der katalysierten Reaktion freigewordene und verstärkte Licht ist ein direktes Ergebnis der enzymatischen Aktivität der aktiven Meerettichperoxidase-Moleküle und damit direkt proportional zu der auf der Membran gebundenen Proteinmenge.

Zur dauerhaften Darstellung und Sicherung wurden die lumineszierenden Proteinbanden durch Autoradiographie für 3 Minuten auf Röntgenfilme (Kodak) übertragen, entwickelt und fixiert.

Die Lumineszenz der immunoreaktiven Elafin-Banden wurde semiquantitativ, durch die densitometrische Bestimmung der Intensität der Banden im Vergleich zur Positivkontrolle ermittelt und prozentual ins Verhältnis gesetzt. Hierbei fand das Programm Photoshop Elements 9 (Adobe Systems) Anwendung.

#### **4.7    Datenanalyse**

Die klinischen Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

Die Laborergebnisse wurden als Median mit Quartilen angegeben.

Die Gruppen wurden mittels Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-Test statistisch verglichen. Die Korrelation zwischen den Variablen wurde mit Hilfe des Spearman-Tests berechnet. Alle Berechnungen erfolgten mit der statistischen Software SPSS (PASW 18.0, SPSS, Chicago, IL, USA).

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Klinische Werte

Für die Kontrollgruppe der parodontal-gesunden Studienteilnehmer konnten neun Personen, fünf Männer und vier Frauen mit einem mittleren Alter von  $33,2 \pm 9,8$  Jahren gewonnen werden.

Die Gingivitisgruppe bestand aus sieben Personen mit einem mittleren Alter von  $38,6 \pm 7,8$  Jahren und einem Mann : Frau-Verhältnis von 3:4.

Die größte Gruppe war mit zehn Probanden, die der chronischen Parodontitis, die ein mittleres Alter der Patienten von  $46,3 \pm 13,1$  Jahren aufwies und aus fünf Männern und fünf Frauen bestand.

Die Gruppe der aggressiven Parodontitis hatte ein Mann : Frau-Verhältnis von 3:2 und ein mittleres Alter von  $39,4 \pm 8,6$  Jahren.

Die demographischen und klinischen Daten der Patienten sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

**Tabelle 1:** Demografische und Klinische Daten

	Kontroll- gruppe n=9	Gingivitis n=7	Chronische Parodontitis n=10	Aggressive Parodontitis n=5
Alter (MW $\pm$ SD) (Jahren)	$33.2 \pm 9.8$	$38.6 \pm 7.8$	$46.3 \pm 13.1$	$39.4 \pm 8.6$
Geschlecht (m:w)	5:4	3:4	5:5	3:2
ST (MW $\pm$ SD) (mm)	$1.65 \pm 0.37$	$2.23 \pm 0.78$	$4.43 \pm 0.74$	$4.67 \pm 0.88$
BOP (MW $\pm$ SD) (%)	$7.20 \pm 10.65$	$80.34 \pm 9.88$	$91.12 \pm 20.24$	$89.67 \pm 10.54$
Zahnanzahl (MW $\pm$ SD)	$27.80 \pm 2.23$	$28.33 \pm 1.63$	$27.33 \pm 2.89$	$27.31 \pm 2.43$

Die Anzahl der vorhandenen Zähne war in allen Untersuchungsgruppen mit mindestens 27 Zähne pro Proband, annähernd gleich, d.h. alle Probanden waren nahezu vollbezahnt.

Die beiden Parodontitisgruppen wiesen erhöhte Sondierungstiefen zwischen 4,40-4,67 mm auf.

Sowohl in der Gingivitisgruppe als auch in den Gruppen mit chronischer und aggressiver Parodontitis waren gegenüber der gesunden Kontrollgruppe deutlich



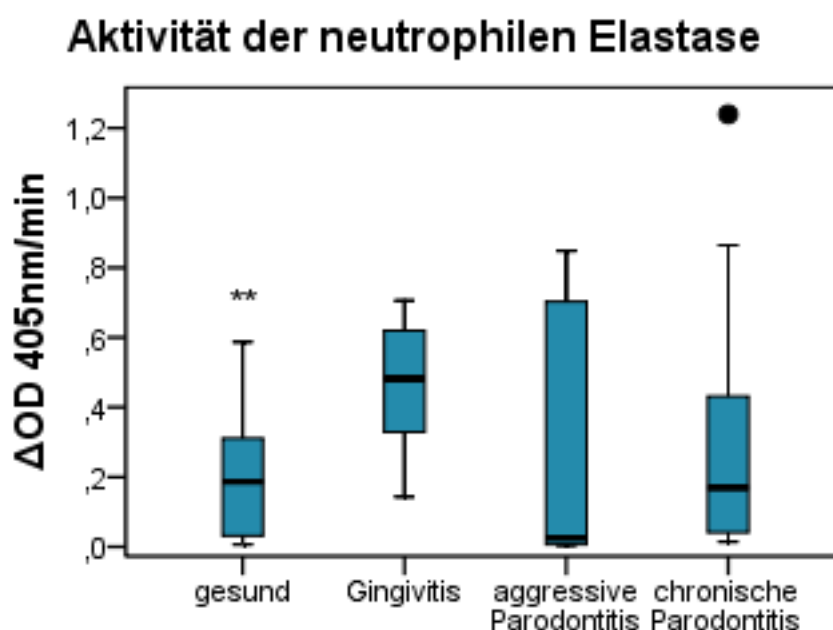
erhöhte Blutungsindizes als Ausdruck der Aktivität des Entzündungsgeschehens feststellbar. Den höchsten Blutungsindex mit 91,12% hatte die CP-Gruppe.

## 5.2 Aktivität der Serinproteasen neutrophile Elastase und Proteinase 3

Die Aktivität der neutrophilen Elastase variierte nur gering zwischen den einzelnen Gruppen (Abb. 2). Die höchsten Aktivitätswerte wurden in der Gingivitisgruppe gemessen, die Enzymaktivitäten in den Sulkusflüssigkeitsproben der Gruppen CP und AP war jedoch nur geringfügig niedriger.

Die AP-Gruppe wies vereinzelt hohe Werte auf, im Median wurden hier aber sehr niedrige Enzymaktivitäten festgestellt.

Ein signifikanter Unterschied der Enzymaktivität konnte lediglich für die gesunde Kontrollgruppe im Vergleich zur Gingivitisgruppe gefunden werden ( $p=0,03$ ).

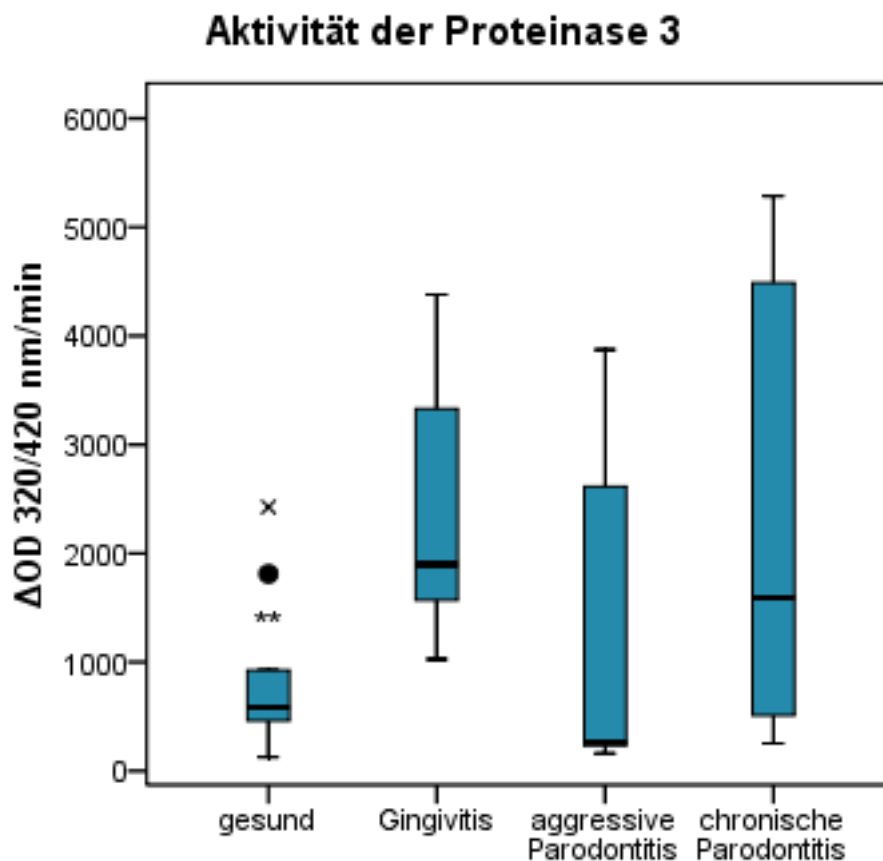


**Abbildung 2:** Enzymaktivität ( Median, Quartile, 10 und 90 Procentile sowie Ausreißer) der neutrophilen Elastase bestimmt mittels Absorptionsänderung des chromogenen Substrates (N-MeoSuc-AAPVpNA) bei  $\lambda=405$  nm über 30 min unterteilt in die einzelnen Untersuchungsgruppen.

Auch die Aktivität der Proteinase 3 zeigt eine ähnliche Tendenz zwischen den einzelnen Untersuchungsgruppen (Abb. 3, S. 53).

Das Aktivitätsmaximum wurde in der Gingivitisgruppe gemessen, die Aktivitäten in der Gruppe CP und AP waren geringer. In der AP-Gruppe ist wiederum eine große Spannbreite bei niedrigem Median auffällig.

Die geringsten Aktivitäten der Proteinase 3 konnte in der Sulkusflüssigkeit der parodontal Gesunden detektiert werden. Jedoch verfehlte hier der Aktivitätsunterschied zwischen der Gingivitisgruppe und der Kontrollgruppe knapp die statistische Signifikanz ( $p=0,07$ ).



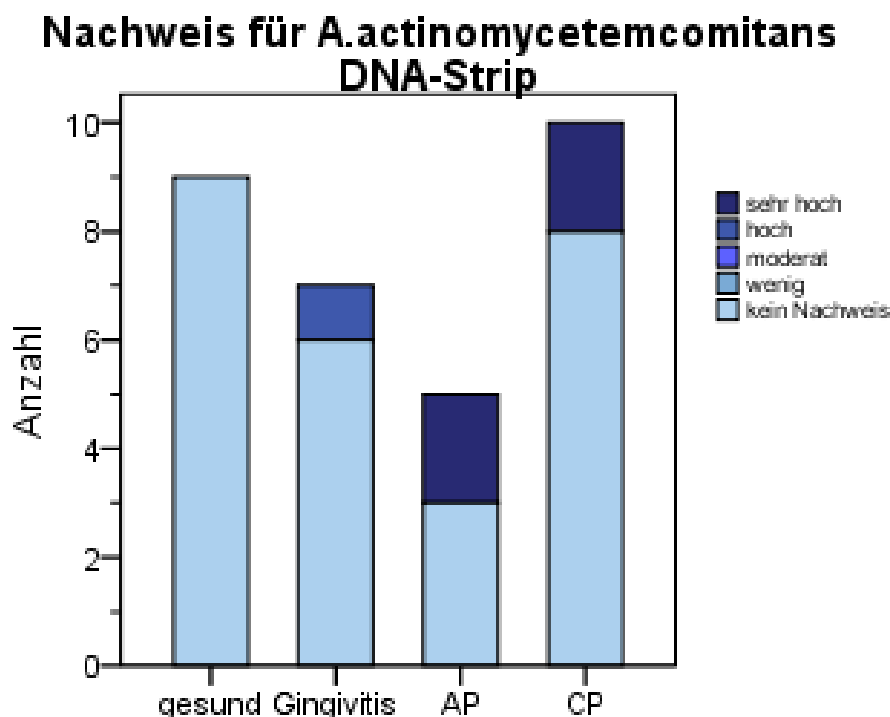
**Abbildung 3:** Bestimmung der mittleren Enzymaktivität (Median, Quartile, 10 und 90 Percentile sowie Ausreißer) der Proteinase 3 mittels der Absorptionsänderung bei  $\lambda=320/420$  nm/min für 30 min für das chromogene Substrat (Abz-GVADnVADYQ-Y(NO)<sub>2</sub>-D) unterteilt in die einzelnen Untersuchungsgruppen.

### 5.3 Mikrobiologischer Nachweis des parodontopathogenen Keimspektrums

Für die parodontalgesunde Kontrollgruppe konnte keine der fünf ausgewählten Bakterienspezies, die im Zusammenhang mit der parodontalen Entzündungsreaktion stehen, nachgewiesen werden. In den Untersuchungsgruppen mit parodontaler Erkrankung (Gingivitis, CP und AP) wurden alle der fünf untersuchten Bakterienspezies mehr oder weniger oft detektiert.

#### 5.3.1 **Aggregatibacter actinomycetemcomitans**

*A. actinomycetemcomitans* konnte bei zwei Patienten (40%) mit AP und bei 2 Patienten (20%) mit CP nachgewiesen werden (Abb. 4). Bemerkenswert ist, dass bei einem Patienten mit AP sehr hohe Keimbelastungen an *A. actinomycetemcomitans* ohne Nachweis der anderen untersuchten Bakterienspezies detektiert wurden. Sein Auftreten war stets mit einer hohen bzw. sehr hohen Bandenintensität assoziiert.



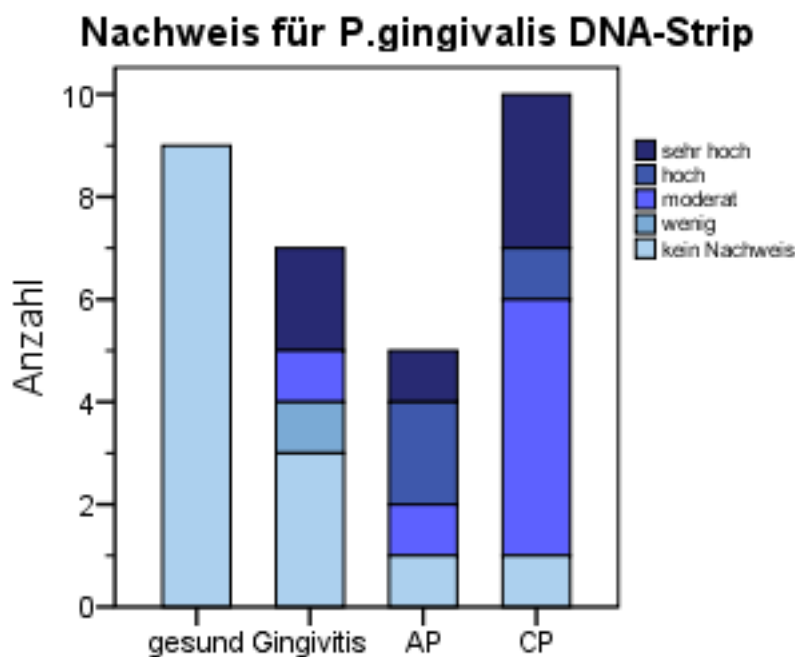
**Abbildung 4:** Darstellung der Häufigkeitsverteilung der relativen Bandenintensität beim Nachweis von *A. actinomycetemcomitans* mittels DNA-Strip-Technologie.

### 5.3.2 Porphyromonas gingivalis

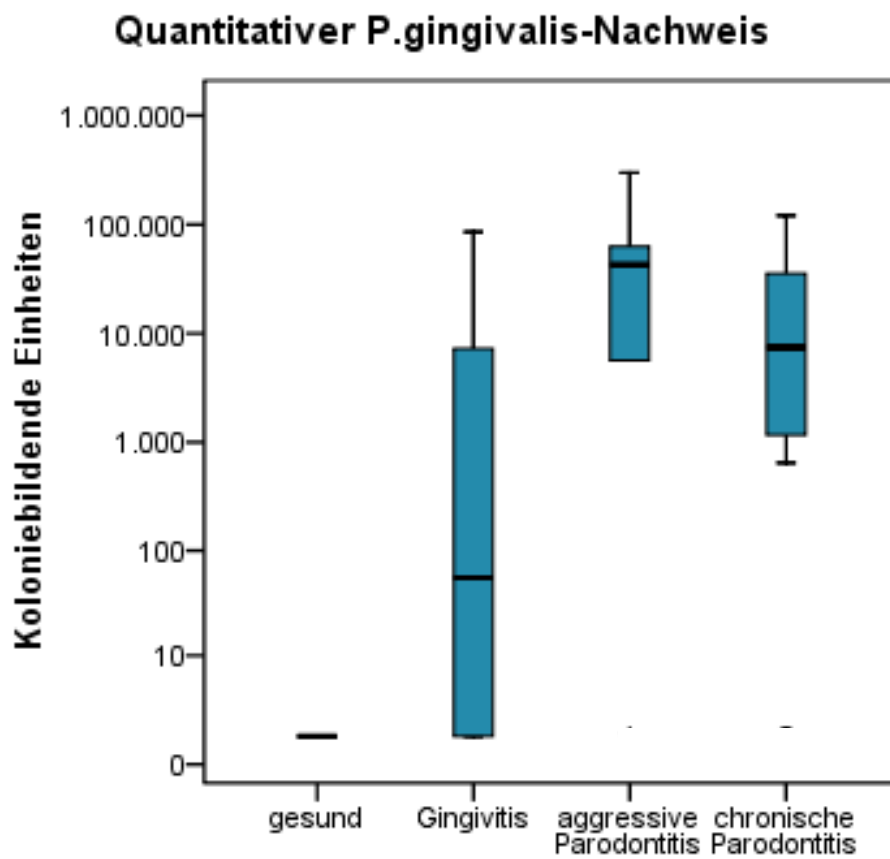
*P. gingivalis* wurde bei der Hälfte der Gingivitispatienten und bei mehr als 80% der Patienten mit Parodontitis (AP und CP) nachgewiesen (Abb. 5). Dabei war die größte Keimbelastung in der Sulkusflüssigkeit der Patienten mit AP (Mittel  $1,07 \times 10^6$ ) in der PCR nachweisbar (Abb. 6, S. 45).

Die zweithöchste Belastung ( $2,27 \times 10^5$ ) wurde bei Patienten mit CP ermittelt, gefolgt von der Gingivitisgruppe, die die geringsten Bakterienzahlen aufwies (Mittel:  $1,40 \times 10^3$ ).

Das Vorhandensein einer Bande für die Bakterienart *P. gingivalis* auf dem Teststreifen der DNA-Strip-Technologie korrelierte mit dem Nachweis einer positiven Keimbelastung in der Real-time PCR. Der Korrelationskoeffizient R nach Spearman für den quantitativen Bakteriennachweis beider Methoden war 0,952 ( $p < 0,001$ ).



**Abbildung 5:** Darstellung der Häufigkeitsverteilung der relativen Bandenintensität beim Nachweis von *P.gingivalis* mittels DNA-Strip-Technologie.



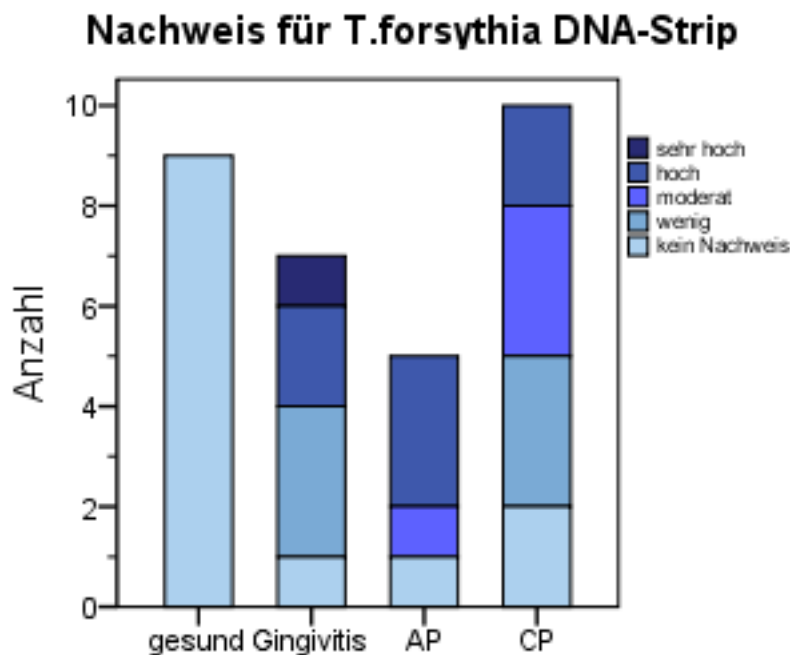
**Abbildung 6:** Quantitativer Nachweis der Keimbelastung mit *P.gingivalis* mittels Real-time-PCR.

### 5.3.3 *Tannerella forsythia*

*T. forsythia* war in allen drei Gruppen mit parodontaler Erkrankung (Gingivitis, CP und AP) sehr häufig vertreten und trat in jeder der Gruppen mit einer Prävalenz von mindestens 80% auf (Abb. 7).

In der Gingivitisgruppe wurde der Keim am häufigsten (86%) und mit der stärksten Bandenintensität auf dem micro-IDent®-Teststreifen nachgewiesen.

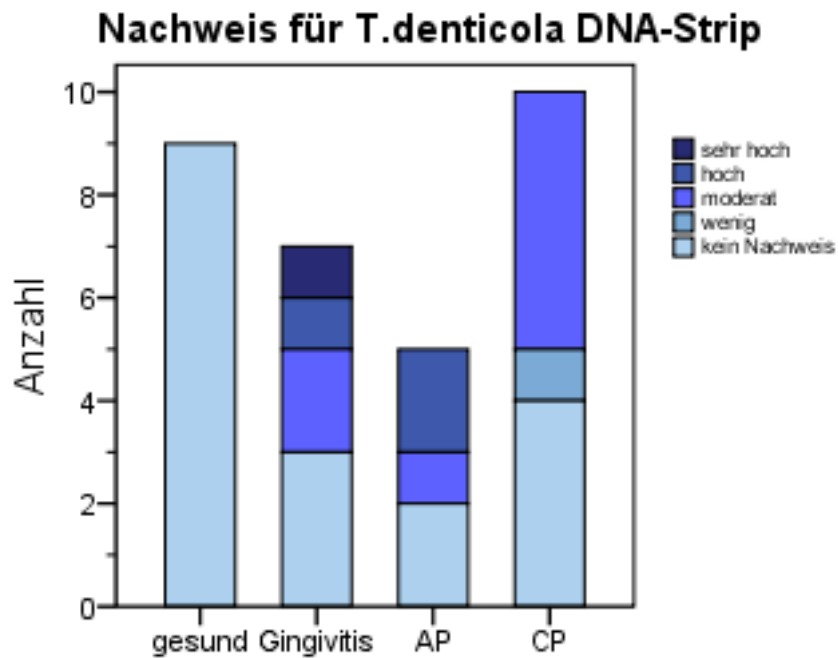
In der CP-Gruppe war trotz gleicher Prävalenz (80%), insgesamt eine geringere Bandenintensität als in AP-Gruppe ersichtlich.



**Abbildung 7:** Darstellung der Häufigkeitsverteilung der relativen Bandenintensität beim Nachweis von *T. forsythia* mittels DNA-Strip-Technologie

### 5.3.4 *Treponema denticola*

Bei fast 2/3 aller Patienten (> 60%) mit parodontaler Erkrankung konnte *T. denticola* nachgewiesen werden. Dabei war die mittlere prozentuale Bandenintensität in der Gingivitisgruppe am höchsten und in der CP-Gruppe am kleinsten (Abb. 8).



**Abbildung 8:** Darstellung der Häufigkeitsverteilung der relativen Bandenintensität beim Nachweis von *T. denticola* mittels DNA-Strip-Technologie.

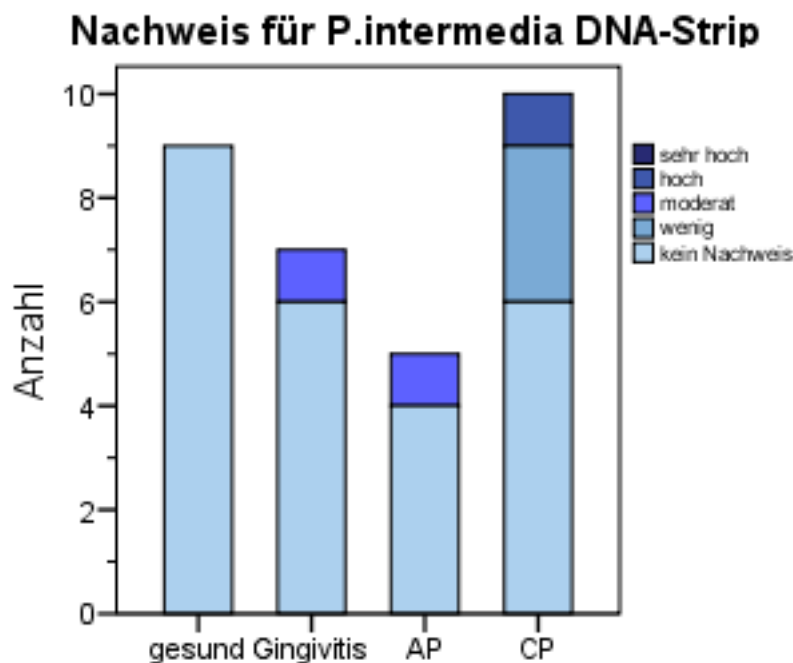
### 5.3.5 *Prevotella intermedia*

*P. intermedia* wurde zwar in allen Gruppen mit parodontaler Erkrankung (Gingivitis, AP und CP) nachgewiesen, jedoch wurde das Bakterium insgesamt nur in sehr wenigen Proben und bis auf einen Fall in der CP – Gruppe auch nur in verhältnismäßig geringen Konzentrationen nachgewiesen. (Abb. 9)

Die geringste Bandenintensität wurde in der Gruppe Gingivitis nachgewiesen, gefolgt von AP und der größten Intensität in CP.

Sowohl in der Gingivitis- (14%) als auch in der AP – Gruppe (20%) wurde *P. intermedia* nur bei jeweils einem Patienten nachgewiesen.

In der CP-Gruppe wurde der Keim bei 40% der erkrankten Patienten detektiert.

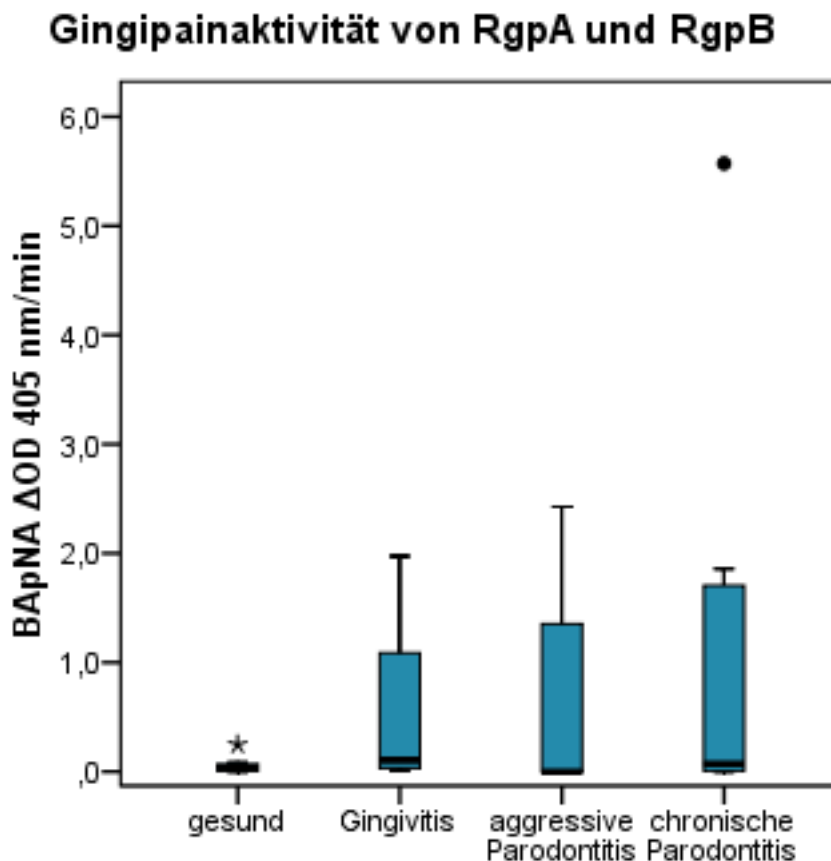


**Abbildung 9:** Darstellung der Häufigkeitsverteilung der relativen Bandenintensität beim Nachweis von *P. intermedia* mittels DNA-Strip-Technologie.



#### 5.4 Enzymaktivität der argininspezifischen Cysteinproteasen

Die Enzymaktivität der argininspezifischen Cysteinproteasen war in der Patientengruppe mit chronischer Parodontitis am höchsten 0,18 U (Abb. 10) und im Vergleich zur festgestellten Enzymaktivität in der gesunden Kontrollgruppe signifikant erhöht ( $p=0,028$ ).



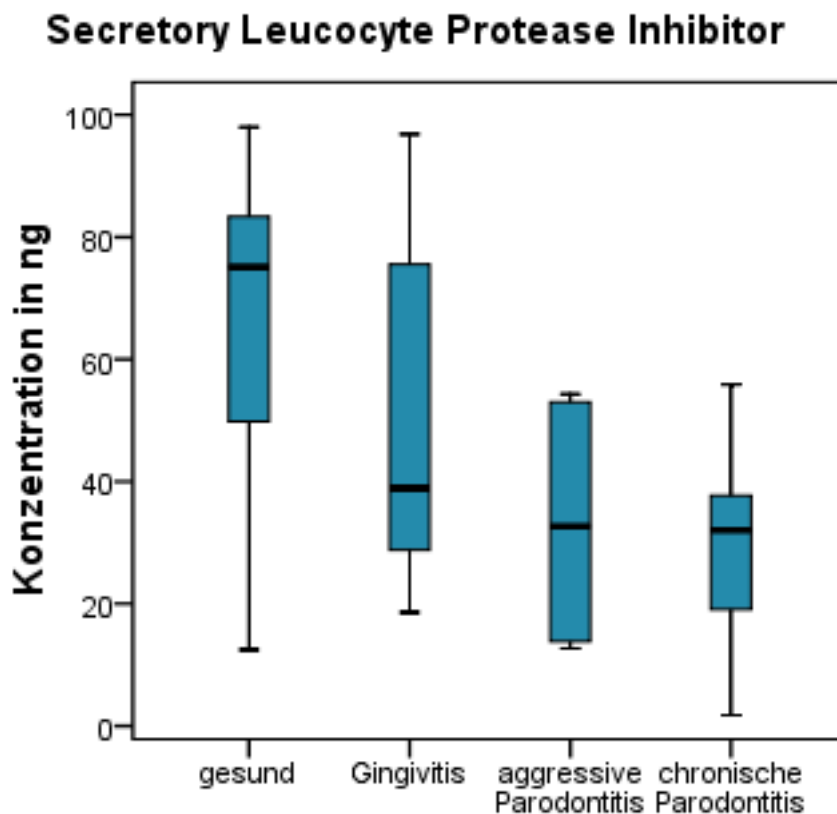
**Abbildung 10:** Bestimmung der Enzymaktivität (Median, Quartile, 10 und 90 Percentile sowie Ausreißer) der Cysteinproteasen RgpA und RgpB mittels Absorbanzmessung des chromogenen Substrates BApNA bei  $\lambda=405\text{nm/min}$  unterteilt nach Untersuchungsgruppen.

## 5.5 Proteasen-Inhibitoren

### 5.5.1 Secretory Leucocyte Protease Inhibitor

Der Proteaseinhibitor SLPI wurde in der gesunden Kontrollgruppe in relativ hohen Konzentrationen und in den Gruppen mit parodontaler Erkrankung (Gingivitis, CP, AP) in geringeren Mengen mit Hilfe des ELISA-Tests nachgewiesen (Abb.11).

Ein statistisch signifikanter Unterschied ( $p=0,043$ ) konnte zwischen der gesunden Kontrollgruppe und der Gruppe CP ermittelt werden.



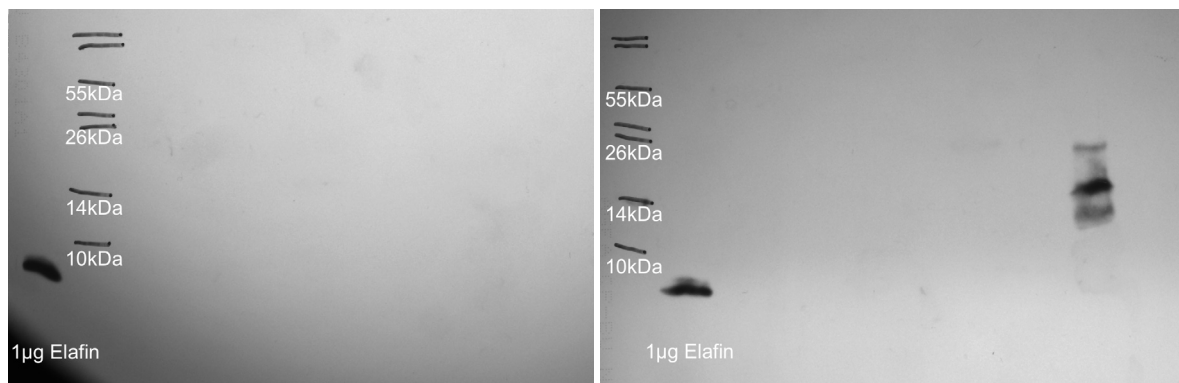
**Abbildung 11:** Nachweis der Konzentration (Median, Quartile, 10 und 90 Percentile sowie Ausreißer) des Proteaseinhibitors SLPI mittels ELISA unterteilt in die Erkrankungsgruppen.

### 5.5.2 Elafin

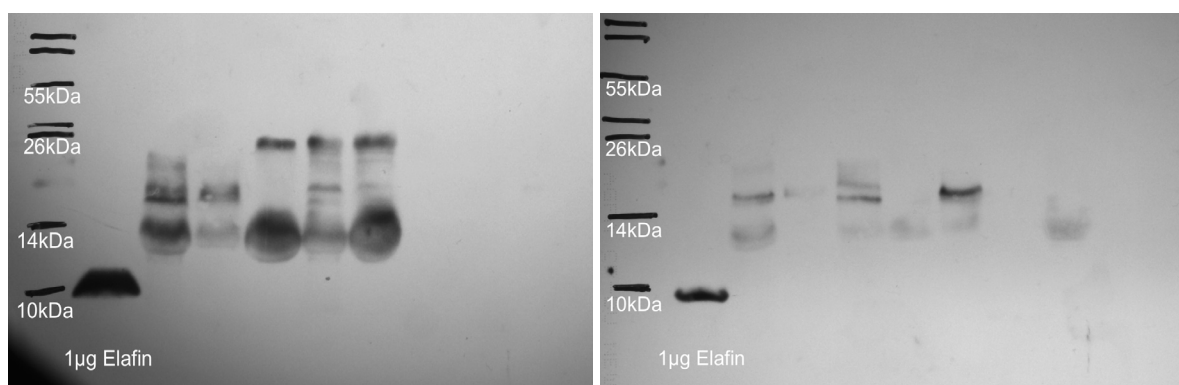
Die Konzentration des von gingivalen Epithelzellen ausgeschütteten Proteaseinhibitors Elafin wurde mit Hilfe von spezifischen Antikörpern mit einem Western Blots bestimmt.

In der Chemolumineszenz konnte in den Gruppen Gingivitis (Abb. 12), AP und CP (Abb. 13) Proteinbanden dargestellt werden. In der Sulkusflüssigkeit der gesunden Kontrollgruppe wurden keine Proteinbanden detektiert. (Abb. 12)

Die mitgelaufene Postitivkontrolle von 1µg Elafin erschien auf jedem Röntgenbild der Western-Blot-Membranen kurz unterhalb der 10kDa des Markers und ist ein Beweis für den korrekten Untersuchungsablauf.



**Abbildung 12:** Darstellung der detektierten Proteinbanden für die gesunde Kontrollgruppe(links) und Gingivitis (rechts)nach 3-minütiger Belichtung der Western-Blot-Membranen auf Filmmaterial. Kontrollgruppe (linkes Bild) ohne Elafinnachweis. Gingivitisgruppe (rechtes Bild) mit nur zwei positiven Sulkusflüssigkeitsproben und dem Intensitätsmaximum um die 14kDa Bande. Postiivkontrolle mit 1µg Elafin unterhalb der 10kDa Markierung.



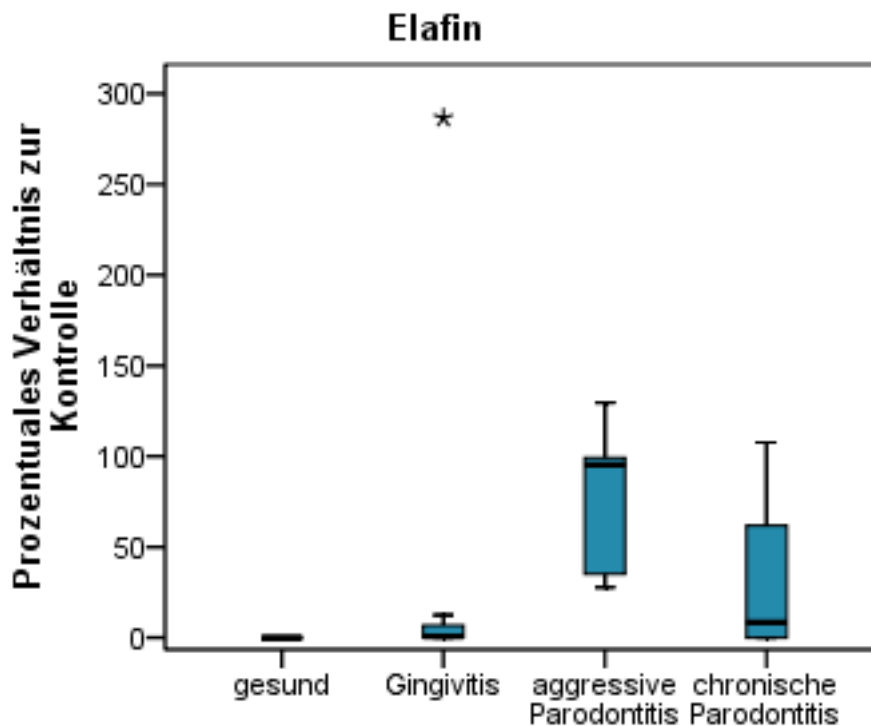
**Abbildung 13:** Darstellung der detektierten Proteinbanden für die Gruppe AP (linkes Bild) und CP (rechtes Bild) nach 3-minütiger Belichtung der Western Blot-Membran auf Filmmaterial. Gruppe AP zeigt in allen Proben eine ähnliche Bandenverteilung und Intensität zwischen 14 – 26kDa. Elafin ist nicht in allen CP-Proben positiv und zeigt engere Gruppierung der Banden um die 14kDa Markierung mit eine geringer Bandenintensität. Die

Postivkontrolle mit 1 µg Elafin zeichnet sich deutlich kurz vor der 10 kDa Markierung auf beiden Röntgenbildern ab.

Die ermittelten Elafinintensitäten für alle Gruppen mit parodontaler Erkrankung unterschieden sich signifikant zur Kontrollgruppe. (Gingivitis ( $p=0,004$ ), AP ( $p=0,001$ ) und CP( $p=0,008$ ))

Die größte Konzentration an Elafin in der Sulkusflüssigkeit wurde in der Gruppe mit AP gefunden. Verglichen mit der AP-Gruppe, kam Elafin bei Patienten mit CP ( $p=0,040$ ) und Gingivitis ( $p=0,042$ ) in deutlich geringeren Konzentrationen vor.

Die nachgewiesene Elafinkonzentrationen in der Gingivitis- und CP-Gruppen unterschieden sich jedoch nur geringfügig (Abb. 14).

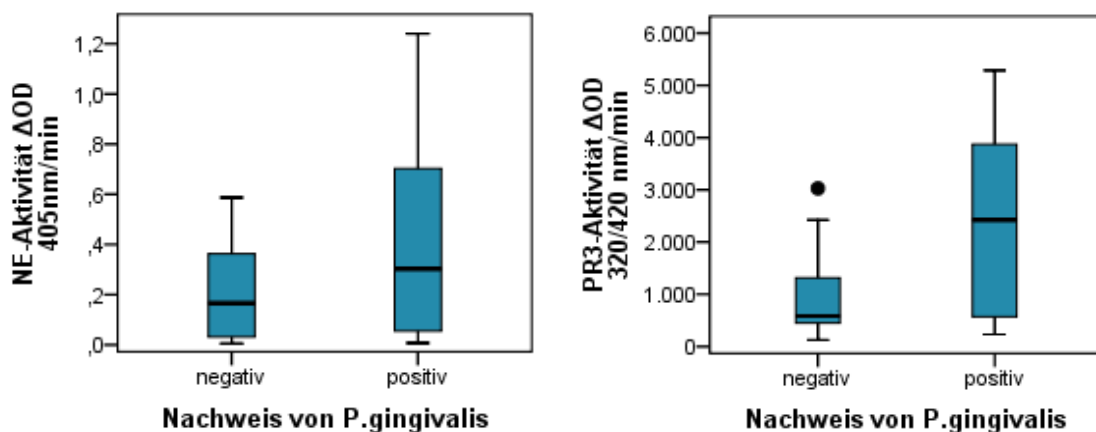


**Abbildung 14:** Prozentuales Verhältnis (Median, Quartile, 10 und 90 Perzentile sowie Ausreißer) des im Western-Blot detektierten Elafin unterteilt in die einzelnen Gruppen.

## 5.6 Assoziation zwischen Serinproteasen, Serin-Proteaseinhibitoren und *P. gingivalis*

Von insgesamt 31 untersuchten Sulkusflüssigkeitsproben konnte für 17 Proben (54%) ein positiver Nachweis für *P. gingivalis* geführt werden.

In diesen positiven Proben wurde auch eine höhere Aktivität der neutrophilen Elastase (Abb. 15) und der Proteinase 3 nachgewiesen, die jedoch lediglich für die Proteinase 3 ( $p=0,035$ ) statistisch signifikant gegenüber den *P. gingivalis* negativen Proben erhöht war (Abb. 15).



**Abbildung 15:** Beziehung zwischen dem Vorkommen von *P. gingivalis* in der Sulkusflüssigkeit und der Aktivität der neutrophilen Elastase und der Proteinase 3.

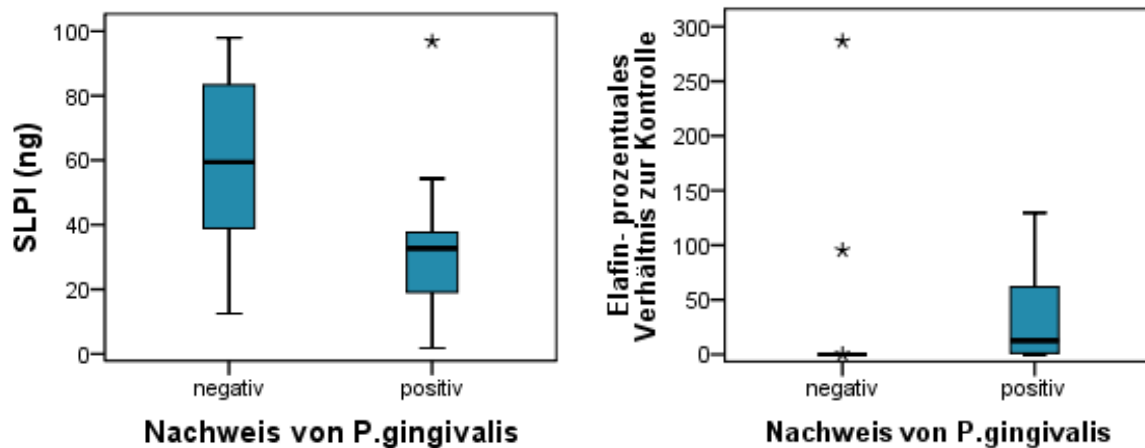
Jedoch ergab sich eine deutliche Korrelation sowohl zwischen der Aktivität der neutrophilen Elastase ( $p=0,008$  ;  $p < 0,01$ ) als auch der Proteinase 3 ( $p=0,003$ ;  $p < 0,01$ ) und dem Vorhandensein von *P. gingivalis* in der Sulkusflüssigkeit.

Auch zwischen den Enzymaktivitäten der beiden Proteasen NE und PR3 ist eine starke, direkte Korrelation erkennbar ( $p=0,000$ ).

Die Konzentrationen der beiden Proteaseinhibitoren SLPI und Elafin korrelierten reziprok zueinander ( $R=-0,378$ ;  $p=0,036$ ).

Elafin korrelierte statistisch signifikant mit *P. gingivalis* ( $R= 0.618$ ;  $p=0,000$ ). Auch der zweite untersuchte Proteaseinhibitor SLPI korreliert zwar mit *P. gingivalis*, ohne jedoch ein statistisch signifikantes Niveau zu erreichen ( $R= -0,320$ ;  $p=0,079$ ) (Abb. 16).

Der SLPI-Nachweis mittels ELISA zeigt hohe Konzentrationen des Proteaseinhibitors in *P. gingivalis*-negativen Sulkusflüssigkeitsproben und signifikant niedrigere Konzentrationen in *P. gingivalis*- positiven Proben ( $p=0,026$ ). Die Elafinkonzentrationen waren in den *P. gingivalis* positiven Proben gegenüber den negativen Proben signifikant erhöht ( $p=0,004$ ).



**Abbildung 16:** Beziehung zwischen dem Vorkommen von *P.gingivalis* in der Sulkusflüssigkeit und Konzentration von SLPI und Elafin im gingivalen Sulkus.

Auffällig war weiterhin die starke Korrelation zwischen der Keimbelastung mit *P. gingivalis* und der Gingipainaktivität ( $R= 0,726$ ;  $p=0,001$ ) in der Sulkusflüssigkeit. Im Gegensatz dazu war jedoch keine Korrelation zwischen den Enzymaktivitäten der Serinproteasen und den Konzentrationen der Serinproteaseninhibitoren zu erkennen.

## **6 Diskussion**

### **6.1 Methodik**

In dieser Studie wurde das Patientengut auf Grundlage der klinischen erhobenen Daten und der daraus abgeleiteten Erkrankung in vier Untersuchungsgruppen einteilt. Die klinischen Daten zwischen den beiden Parodontitisgruppen unterschieden sich nicht. Auch der erhobene Blutungsindex BoP, als Kriterium für den Entzündungszustand der Gingiva zeigte keine Unterschiede zwischen den Patienten der Gingivitisgruppe und den beiden Parodontitisgruppen.

Die Patienten mit aggressiver Parodontitis hatten ein Durchschnittsalter von  $39,4 \pm 8,6$  Jahre, welches höher als das normale Alter bei aggressiver Parodontitis ist. Alle Patienten der Parodontitisgruppen hatten eine generalisierte Form der Erkrankung, wobei die Erstdiagnose teilweise bis zu 20 Jahren zurücklag.

In den Versuchen der vorliegenden Pilot-Studie wurde Sulkusflüssigkeit verwendet, die durch Waschen der Gingivasulci von den Studienteilnehmern gewonnen wurde. Das Auswaschen des Sulkus ist ein etabliertes wissenschaftlichen Verfahren, anhand dessen Bakterienbelastung und Enzymkonzentrationen bestimmt werden können und welches im Vergleich zur Sulkusflüssigkeitsgewinnung mittels Papierstreifen oder Papierspitzen auch eine quantitative Bestimmung der Gingipainkonzentration zulässt (Sigusch et al. 1992, Guentsch et al. 2011).

Die Sulkusflüssigkeit, die in ihrer Zusammensetzung dem Blutplasma ähnelt (Curtis et al. 1990), spiegelt die immunologischen und entzündlichen Reaktionen sowie die spezifischen Wechselwirkungen zwischen Wirt und Mikroorganismen wider, die zu parodontalen Erkrankungen führen. (Imamura et al. 1994, Puklo et al. 2008, Byrne et al. 2015).

In den analysierten Proben war die Aktivität der neutrophilen Serinproteasen NE und PR3 in der Gingivitisgruppe am höchsten. Das Ergebnis einer höheren Aktivität der neutrophilen Elastase bei Patienten mit Gingivitis als auch bei Parodontitispatienten ist gegensätzlich zu Untersuchungen anderer Studien (Figueredo et al. 2005). Diese Unterschiede können teilweise auf unterschiedliche Methoden der Sulkusflüssigkeitsgewinnung zurückgeführt werden, da gezeigt wurde, dass diese

das Ausmaß der gewonnenen neutrophilen Elastase beeinflussen (Guentsch et al. 2011).

Zum Anderen sollte vermerkt werden, dass bei dieser Pilot-Studie nur eine geringe Zahl an Studienteilnehmern eingeschlossen wurde, welches die Aussagekraft der Ergebnisse einschränken könnte.

Ergebnisse anderer Studien unterstreichen die Aussagekraft der neutrophilen Elastase und ihrer Aktivität in der GCF als diagnostischen Marker zur Einschätzung des Aktivitätszustandes parodontaler Entzündung und zur Bestimmung des Behandlungserfolges (Binder und Goodson 1987, Lamster et al. 1988, Yin et al. 2010, Kretschmar et al. 2012).

Die Aktivität der Proteinase 3 wurde bisher nur selten in Sulkusflüssigkeitsproben bestimmt. So kann eine nicht vorhandene Aktivität auf hereditäre Erkrankungen wie z.B. ein Papillon Lefèvre-Syndrom hinweisen (Eick et al. 2014). Die enge Korrelation zwischen der Aktivität der PR3 und der NE scheint auch die PR 3 als diagnostischen Biomarker für Erkrankungsaktivität und Erkrankungsprogression zu qualifizieren.

Der Nachweis des in der Sulkusflüssigkeit vorhandenen parodontopathogenen Keimspektrums erfolgte mittels DNA-Strip Technologie. Der kommerzielle DNA-Test Kit ermöglicht den einfachen semiquantitativen Nachweis der 5 wichtigsten mit Parodontitis assoziierten Bakterienspezies (Moore und Moore 1994, Slots 1999, Lopez 2000, Lovegrove 2004, Socransky und Haffajee 2005), die eng miteinander vergesellschafteten Bakterienspezies des roten Komplexes (Socransky et al. 1998) *P.gingivalis*, *T. forsythia* und *T. denticola*; den schwarzpigmentierten *P. intermedia* des orangen Komplexes und *A. actinomycetemcomitans* aufgrund seiner therapeutischen Relevanz.

Aufgrund seiner herausgehobenen Stellung unter den parodontalpathogenen Erregern und des Studienkonzeptes zur Ermittlung der gingipainabhängigen Spaltung der Serinproteaseinhibitoren wurde für *P. gingivalis* außerdem eine quantitative Bestimmung mittels Real-time PCR durchgeführt.

Die DNA Strip-Technologie ist ein etabliertes Verfahren zum Nachweis der oben genannten Bakterien mit großer Korrelation der Ergebnisse gegenüber anderen nukleinsäure-basierten Verfahren (Haffajee et al. 2009, Eick et al. 2011). Dieses wird ebenfalls durch die gute Übereinstimmung der Ergebnisse des semiquantitativen und quantitativen Nachweises von *P. gingivalis* in dieser Studie untermauert.



Unsere Ergebnisse des mikrobiologischen Nachweises zeigen die große Assoziation von *P. gingivalis*, *T. forsythia* und *T. denticola* und bestätigen somit deren gemeinsames Vorkommen und unterstreichen die Relevanz des roten Komplexes für die Parodontopathien (Socransky et al. 1998).

*P. gingivalis* wies dabei von allen drei Bakterien des roten Komplexes die höchste Prävalenz auf und konnte bei mehr als 80% bei chronischer und aggressiver Parodontitis nachgewiesen werden. Ähnliche Werte wurden auch durch Lopez (Lopez 2000) gefunden.

Auch der quantitative Nachweis bestätigt die Dominanz von *P. gingivalis* bei aggressiver und chronischer Parodontitis so konnten im Mittel 1000-fach höhere Konzentrationen an koloniebildenden Einheiten (KBE) von *P. gingivalis* in Parodontitisgruppen gegenüber der Gingivitisgruppe gefunden werden. Dieses bestätigt Untersuchungen zur Zusammensetzung des oralen Biofilms in Bezug auf parodontale Erkrankungen, in denen bereits 10-fach höhere Konzentrationen an KBE den Unterschied zwischen Gesundheit und Erkrankung machen (Lovegrove 2004).

*T. forsythia* der mit großer Prävalenz in der Gingivitisgruppe und den Parodontitisgruppen nachgewiesen wurde, ist stark mit dem Übergang von parodontaler Gesundheit zur Parodontitis assoziiert (Tanner et al., 1998). Seine Rolle in der Pathogenese der Parodontitis, ob als weiterer auslösender Faktor oder unterstützender Spätbesiedler, ist noch nicht abschließend geklärt (Li et al. 2004, Yang et al. 2004, Sharma 2010).

Auch *T. denticola* trat mit hoher Prävalenz in allen Erkrankungsgruppen auf, konnte jedoch in besonders hohen Keimzahlen in der Gingivitisgruppe nachgewiesen werden. Sein Vorkommen korreliert mit dem von *P. gingivalis* und mit den klinischen Indizes BoP, ST und Attachmentverlust (Kigure et al. 1995, Sela 2001, Takeuchi et al. 2001, Socransky und Haffajee 2005, Dashper et al. 2011).

*A. actinomycetemcomitans* wurde nur in wenigen Sulkusflüssigkeitsproben nachgewiesen. Obwohl er in der AP-Gruppe mit der größten Prävalenz auftrat, wurde er auch in der CP- und Gingivitisgruppe nachgewiesen. Dieses ist in Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen (Slots und Ting 1999, Lopez 2000, Yang et al. 2005). Entgegen früherer Annahmen ist der Nachweis von *A. actinomycetemcomitans* weder das entscheidende Diagnosekriterium, noch der

alleinige krankheitsauslösende Faktor einer aggressiven Parodontitis (Nibali 2015). Eine Unterscheidung der einzelnen Serotypen a-f (Henderson et al. 2010, Raja et al. 2014) und deren Verteilung auf die einzelnen Erkrankungsformen erfolgte aufgrund des Studiendesigns nicht.

Auch der Nachweis von *P. intermedia* untermauert seine Assoziation mit parodontalen Erkrankungen. Seine geringen Keimzahlen im Vergleich mit den anderen parodontopathogenen Bakterienspezies sind in Übereinstimmung mit anderen Untersuchungsergebnissen (Lopez 2000, Torresyap et al. 2003).

Sein gehäuftes Auftreten in der CP-Gruppe lässt einen Rückschluss auf mögliche Interaktionen mit *P. gingivalis* zu (Byrne et al. 2013, Byrne et al. 2015).

Insgesamt zeigt der mikrobiologische Nachweis, vor allem der Spezies des roten Komplexes, die große Assoziation und Relevanz dieser Bakteriengruppe bei Initiation und Progression der parodontalen Erkrankung (Socransky et al. 1998, Lopez 2000, Kolenbrander 2000, Socransky und Haffajee 2005, Haffajee et al. 2008, Darveau et al. 2012).

Insbesondere *P. gingivalis* und seinem Hauptvirulenzfaktoren, den Gingipainen fällt dabei eine Schlüsselrolle zu (Imamura 2003, Potempa et al. 2003, Guyot et al. 2010). Er übt weitreichende pro-inflammatorische Einflüsse auf die Gefäßpermeabilität und Blutgerinnung aus (Imamura et al. 1994, Imamura et al. 1997), fördert den Abbau von extrazellulären Matrixproteinen (Potempa et al. 2000, Imamura 2003), Zytokinen (Oleksy et al. 2002, Kobayashi-Sakamoto et al. 2003) Zelladhäsionsmolekülen (Tada et al. 2003) und Proteaseinhibitoren (Into et al. 2006, Kantyka et al. 2009, Yin et al. 2010, Laugisch et al. 2012, Kretschmar et al. 2012), um günstige Wachstumsbedingung schaffen und sich der Immunantwort zu entziehen. Seine potente Beeinflussung der angeborenen Immunabwehr (Potempa und Pike 2009) über den Abbau des CD14 – Rezeptors auf Makrophagen (Tada et al. 2002), Hemmung der Leukozytenaktivierung über der LPS-Rezeptor (Imamura et al. 1997) Modulation der Funktion neutrophiler Granulozyten (Hajishengallis et al. 2015, Olsen und Hajishengallis 2016) und über die Beeinflussung der Komplementfaktoren C3 und C5 (Wingrove et al. 1992, Jagels et al. 1996, Potempa und Pike 2009) führt zur einer Veränderung der Zusammensetzung und der Quantität der vorhandenen normalen oralen Mikroflora. Diese Veränderung der oralen kommensalen Mikroflora zeigt sich für den parodontalen Knochenabbau verantwortlich.

Das durch *P. gingivalis* verursachte Ungleichgewicht zwischen negativ modulierter Immunabwehr und dentaler Plaque scheint für die Initiation der Parodontitis entscheidend zu sein, weshalb er als „Keystone pathogen“ für parodontale Erkrankungen herausgehoben wird (Darveau et al. 2012, Hajishengallis et al. 2012, Hajishengallis et al. 2015, Olsen und Hajishengallis 2016).

## **6.2 Gingipaine, Serinproteasen und Serinproteaseinhibitoren**

In vivo wird die Aktivität der neutrophilen Elastase und der Proteinase 3 sofort durch endogene Inhibitoren reguliert (Wiedow und Meyer-Hoffert 2005, Fitch et al. 2006, Korkmaz et al. 2008, Pham 2008, Summers et al. 2010).

SLPI und Elafin sind zwei Inhibitoren die in epithelialen Zellen, einschließlich gingivalen Epithelzellen (Yin et al. 2010), Zellen des Immunsystems, im entzündeten Gewebe oder bei PMNL-Infiltration produziert werden (Fitch et al. 2006).

Unsere Ergebnisse zeigen hohe Konzentrationen von SLPI bei den gesunden Personen. Jedoch nimmt mit fortschreitender Entzündung die nachgewiesene Konzentration ab und ist am deutlichsten in der Gegenüberstellung der Abhängigkeit von SLPI und Gingipainen erkennbar.

Interaktionen von *P. gingivalis* mit Epithelzellen führen zur vermehrten SLPI-Freisetzung (Yin et al. 2010). Gleichzeitig sind die argininspezifischen Gingipaine RgpA und RgpB zur Spaltung von SLPI befähigt (Into et al. 2006, Yin et al. 2010). In vitro findet bei Konzentrationen von 100 nM der Rgps eine vollständige Spaltung von SLPI statt. Bereits 10 nM reichen jedoch aus, um SLPI als Inhibitor der neutrophile Elastase funktionslos werden zu lassen (Into et al. 2006).

Es konnten Konzentrationen von bis zu 1500 nM an argininspezifischen Gingipainen in *P. gingivalis* positiver Sulkusflüssigkeit nachgewiesen werden (Guentsch et al. 2011). Somit ist davon auszugehen, dass der Proteaseinhibitor auch in vivo gespalten oder zumindest inaktiviert werden kann.

Wie bei Into et al. (Into et al. 2006) zeigen auch die Ergebnisse dieser Studie niedrige Konzentrationen von SLPI in der Sulkusflüssigkeit von Patienten mit positivem *P. gingivalis*-Nachweis.

Eine negativer Zusammenhang bestand ebenfalls zwischen dem Nachweis von *A. actinomycetemcomitans* und SLPI. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass eine verminderte SLPI-Freisetzung auch durch die von *A. actinomycetemcomitans*

produzierten Virulenzfaktoren wie Leukotoxin A und das zytolethale distending Toxin (Kachalany 2010) möglicherweise nicht auszuschließen ist.

Vergleichende Untersuchungen an Bronchialsektret von gesunden und atemwegserkrankten Patienten zeigten ebenfalls höhere Konzentrationen an SLPI bei gesunden Personen und werden einer grundlegenden Schutzschildfunktion von SLPI gegenüber Proteasen zugeschrieben (Van Seuningen et al. 1995) und würde ebenfalls eine Erklärung für die verringerten SLPI-Konzentrationen bei Entzündungszuständen liefern (Williams et al. 2006).

Auch die Empfindlichkeit von SLPI gegenüber dem Abbau durch wirtseigene Proteasen wie Cathepsin B, L und S, die in Makrophagen, Fibroblasten und Epithelzellen produziert werden (Taggart et al. 2001) und mag zu dieser Korrelation beitragen. Aktives Cathepsin B wurde ebenfalls in hohen Konzentrationen in der Sulkusflüssigkeit von Parodontitispatienten nachgewiesen (Cox et al. 2006). Zusammenfassend ist ein gemeinsames Agieren von wirtseigenen und bakteriellen Proteasen zusammen mit unbekannten Faktoren für die verringerte SLPI-Freisetzung verantwortlich und tragen damit entscheidend zum Fehlen dieses körpereigenen Inhibitors und seiner anti-bakteriellen, anti-viralen und anti-inflammatorischen Effekte (Taggart et al. 2001, Cox et al. 2006, Yin et al. 2010) im entzündeten Parodont bei.

Ähnlich wie SLPI wird auch Elafin vorrangig konstitutiv in Epithelzellen in geringen Konzentrationen expremiert (Fitch et al. 2006) und seine Freisetzung unter entzündlichen Bedingungen, durch die pro-inflammatorischen Zytokinen IL-1 und TNF- $\alpha$ , bakterielle LPS und die NE stark erhöht (Sallenave et al. 1994). Der zytokin-vermittelte Anstieg der Elafinkonzentration als Inhibitor der neutrophilen Elastase und Proteinase 3 ist deutlich höher als bei SLPI (Williams et al. 2006). Deshalb wird Elafin eine größere Rolle beim Schutz des Gewebes während des Entzündungsgeschehens zugeschrieben, wohingegen SLPI wahrscheinlich eher für den Basalschutz im gesunden Gewebe verantwortlich ist (Sallenave et al. 1994, Van Seuningen et al. 1995).

Die hier nachgewiesenen hohen Elafin-Konzentrationen in der Parodontitis- und der Gingivitisgruppe scheinen diese Hypothese zu bestätigen.

Des Weiteren konnten wir eine starke positive Korrelation zwischen *P. gingivalis*, der Gingipainaktivität und Elafin aufzeigen. Doch gerade diese Korrelation erscheint vor dem Hintergrund der in vitro nachgewiesenen Spaltung und effizienten Inaktivierung Elafins durch Rgps (Kantyka et al. 2009) kontrovers.

Prinzipiell ist Elafin ein sehr stabiles Protein, welches sich sehr resistent gegen proteolytische Spaltung (Guyot et al. 2010) zeigt.

Jedoch sind die arginin-spezifischen Gingipaine zu einer begrenzten proteolytischen Spaltung an einer einzigen Peptidbindung im reaktiven Zentrum Elafin befähigt (Kantyka et al. 2009). Während diese Inaktivierung bereits bei 0,5nM RgpB zwar beginnt, tritt eine erkennbare Spaltung erst bei einer Konzentration von 100nM RgpB auf. Die von Kantyka et al. (Kantyka et al. 2009) beschriebene unzulängliche Spaltung von Elafin würde eine Erklärung für das Fehlen von Elafinspaltprodukten in den untersuchten Sulkusflüssigkeitsproben liefern.

Jedoch ist fraglich, ob das in der Sulkusflüssigkeit der Parodontitispatienten nachgewiesene Elafin überhaupt aktiv ist. Eine mittlere Rgp-Konzentrationen von 58 nM in der Sulkusflüssigkeit (Guentsch et al. 2011) übersteigt die zur Inaktivierung benötigte Konzentration bereits 100-fach.

Die Western-Blot Analyse zeigt, dass das eigentlich 9,9 kDa große Elafin (Fitch et al. 2006) in der Sulkusflüssigkeit praktisch nicht vorkommt. Das nachgewiesene größere Molekulargewicht stellt wahrscheinlich die Elafinvorstufe Trappin-2 dar, welche kovalent an extrazelluläre Matrixproteine gebunden ist (Guyot et al. 2005, Baranger et al. 2011).

Elafin tritt in vivo hauptsächlich als Trappin-2 auf, welches ein höheres Molekulargewicht von 13-15kDa (Zani et al. 2004) besitzt und in die Extrazellulärmatrix über eine Typ-2 Transglutaminase eingebunden ist (Guyot et al. 2005). In vitro führen sowohl Elafin als auch Trappin- 2 zu einer ähnlichen Inaktiverung der NE und der PR3 (Zani et al. 2004). Diese Bindung von Elafin an die extrazelluläre Matrix, gewährleistet eine Ortsständigkeit des Inhibitors und bietet diesen Proteinen Schutz vor proteolytischem Abbau durch die neutrophilen Serinproteasen, wodurch weitere Kollateralschäden verhindert werden (Williams et al. 2006). Dieses erklärt, dass die detektierten Proteinbanden der Sulkusflüssigkeit ein größeres Molekulargewicht haben als ungebundenes Elafin.

Die positive Korrelation zwischen *P. gingivalis*, Gingipainaktivität und Elafin könnte sich auch anders erklären lassen. Gingipaine spalten auch andere extrazelluläre Matrixmoleküle wie Fibronectin (Baba et al. 2001, Budu et al. 2003, Holt und Ebersole 2005, Stathopoulou et al. 2009). Fibronectin kommt zahlreich in der Gingiva vor und stellt den vorrangigen Bindungspartner für Trappin-2 dar (Guyot et al. 2005).

Auch andere parodontopathogene Bakterien wie *T. denticola* und *T. forsythia* die in großer Assoziation zu *P. gingivalis* vorkommen (Socransky et al. 1998) könnten eine Rolle bei der Elafinfreisetzung durch Fibronectinabbau mit Hilfe ihrer Proteasen (Bamford et al. 2010) spielen, da auch die Keimbelastung von *T. denticola* und *T. forsythia* mit der Elafinmenge korreliert.

Die Annahme, dass bakterielle Proteasen die Elafin-Freisetzung aus der extrazellulären Matrix über die Fibronectin-Spaltung regulieren können, wird durch die Anwesenheit multipler Fibronectinfragmente von 40 kDa, 68kDa und 120 kDa in der Sulkusflüssigkeit von Parodontitispatienten (Huynh et al. 2002) gestützt.

Durch den Abbau und die Inaktivierung von SLPI und Elafin werden neben der inhibitorischen Funktion auf Serinproteasen, auch weitere Funktionen wie Entzündungsauflösung und Geweberegeneration (Williams et al. 2006), Chemotaxis und Opsonierung, antibakterielle Eigenschaften, Einflüsse auf die angeborene und erworbene Immunantwort moduliert (Williams et al. 2006).

Schließlich tragen so die freigesetzte neutrophile Elastase, die Proteinase 3 und die Beseitigung der immunmodulatorischen Funktion der Serinproteaseinhibitoren gemeinsam zum voranschreitenden Gewebeverlust und der Aufrechterhaltung der bakteriellen Dysbiose bei.

## 7 Schlussfolgerungen

Die Keimzahlen von *P. gingivalis* korrelieren positiv mit der Gingipainaktivität, der Aktivität der neutrophilen Elastase und der Elafinkonzentration in der Sulkusflüssigkeit.

Die Proteinase 3-Aktivität kann in der Sulkusflüssigkeit gemessen werden und eignet sich aufgrund der Korrelation der Enzymaktivität zur Neutrophilen Elastase als Marker für die Erkrankungsaktivität und den Schweregrad einer Parodontitis.

Das lösliche SLPI wird direkt durch bakterielle und wirtseigene Proteasen im entzündeten Gebiet abgebaut.

Das an die extrazelluläre Matrix gebundene Elafin, welches auf inflammatorische Reize verstärkt im Entzündungsgebiet freigesetzt wird, widersteht dem vollständigen Abbau durch Gingipaine. Die hohe Aktivität der Serinproteasen sind ein Hinweis für eine begrenzte Proteolyse im inhibitorischen Zentrum und somit Inaktivierung des Elafins.

*P. gingivalis* positive Sulkusflüssigkeit steht in engen Zusammenhang mit der dysregulierten, neutrophil gesteuerten Entzündungsantwort und ihren Inhibitoren. Durch die deutliche Aktivität der Serinproteasen in *P. gingivalis* - positiven Proben werden trotz vorhandener Inhibitoren bakteriell günstige Nährstoffvoraussetzungen geschaffen.

Fehlende oder inaktive Serinproteaseinhibitoren verstärken das Ungleichgewicht zwischen Target und Inhibitor mit der Folge einer übermäßigen Aktivität der Serinproteasen im entzündeten Gebiet.

## **Literaturverzeichnis**

- Aas J, Paster B, Stokes L, Olsen I, Dewhirst FE. 2005. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol*, 43(11):5721-5732.
- Ainamo J, Barmes D, Beargie G, Cutress T, Martin J, Sardo-Infirri J. 1982. Development of the World Health Organization (WHO) community periodontal index of treatment needs (CPITN). *Int Dent J*, 32(3):281-291.
- Albandar JM, Olsen I, Gjermo P. 1990. Associations between six DNA probe-detected periodontal bacteria and alveolar bone loss and other clinical signs of periodontitis. *Acta Odontol Scand*, 48(6):415-423.
- Amano A, Sojar HT, Lee JY, Sharma A, Levine MJ, Genco RJ. 1994. Salivary receptors for recombinant fimbriin of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*, 62(8):3372-3380.
- Amin M, Ho AC, Lin JY, Batista da Silva AP, Glogauer M, Ellen RP. 2004. Induction of De Novo Subcortical Actin Filament Assembly by *Treponema denticola* Major Outer Sheath Protein. *Infect Immun*, 72(6):3650-3654.
- Arakawa S, Nakajima T, Ishikura H, Ichinose S, Ishikawa I, Tsuchida N. 2000. Novel apoptosis-inducing activity in *Bacteroides forsythus*: a comparative study with three serotypes of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun*, 68(8):4611-4615.
- Armitage G. 1999. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*, 4(1):1-6.
- Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. 1996. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal Pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol*, 11(4):266-273.
- Baba A, Abe N, Kadowaki T, Nakanishi H, Ohishi M, Asao T, Yamamoto K. 2001. Arg-gingipain is responsible for the degradation of cell adhesion molecules of human gingival fibroblasts and their death induced by *Porphyromonas gingivalis*. *Biol Chem*, 382(5):817-824.
- Bamford C, Francescutti T, Cameron C, Jenkinson H, Dymock D. 2010. Characterisation of a novel family of fibronectin-binding proteins with M23 peptidase domains from *Treponema denticola*. *Mol Oral Microbiol*, 25(6):369-383.
- Banbula A, Yen J, Oleksy A, Mak P, Bugno M, Travis J, Potempa J. 2001. *Porphyromonas gingivalis* DPP-7 represents a novel type of dipeptidylpeptidase. *J Biol Chem*, 276(9):6299-6305.



- Baranger K, Zani ML, Labas V, Dallet-Choisy S, Moreau T. 2011. Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) is, like its homologue trappin-2 (pre-elafin), a transglutaminase substrate. *PLoS One*, 6(6):e20976.
- Bergenfeldt M, Axelsson L, Ohlsson K. 1992. Release of neutrophil proteinase 4(3) and leukocyte elastase during phagocytosis and their interaction with proteinase inhibitors. *Scand J Clin Lab Invest*, 52(8):823-829.
- Binder TA, Goodson JM SO. 1987. Gingival fluid levels of acid and alkaline phosphatase. *J Periodontal Res*, 22(1):14-19.
- Borrell L, Papapanou P. 2005. Analytical epidemiology of periodontitis. *J Clin Periodontol*, 32(6):132-158.
- Brisette CA, Lukehart SA. 2007. Mechanisms of Decreased Susceptibility to  $\beta$ -Defensins by *Treponema denticola*. *Infect Immun*, 75(5):2307-2315.
- Bryzek D, KS, Koziel J, Potempa J. 2014. A pathogenic trace of *Tannerella forsythia* - shedding of soluble fully active tumor necrosis factor  $\alpha$  from the macrophage surface by karilysin. *Mol Oral Microbiol*, 29(6):294-306.
- Budu CE, Luengpailin J, Reyes G, Doyle RJ, Cowan MM. 2003. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis* are modified by polyphenol oxidase and asparaginase. *Oral Microbiol Immunol*, 18(5):313-317.
- Byrne DP, Manandhar SP, Potempa J, Smalley JW. 2015. Breakdown of albumin and haemalbumin by the cysteine protease interpain A, an albuminase of *Prevotella intermedia*. *BMC Microbiol*, 15(1):185.
- Byrne DP, Potempa J, Olczak T, Smalley JW. 2013. Evidence of mutualism between two periodontal pathogens: co-operative haem acquisition by the HmuY haemophore of *Porphyromonas gingivalis* and the cysteine protease interpain A (InpA) of *Prevotella intermedia*. *Mol Oral Microbiol*, 28(3):219-229.
- Chen T, Duncan MJ. 2004. Gingipain adhesin domains mediate *Porphyromonas gingivalis* adherence to epithelial cells. *Microb Pathog*, 36(4):205-209.
- Choi BK, Lee HJ, Kang JH, Jeong GJ, Min CK, Yoo YJ. 2003. Induction of Osteoclastogenesis and Matrix Metalloproteinase Expression by the Lipooligosaccharide of *Treponema denticola*. *Infect Immun*, 71(1):226-233.
- Chu L, Ebersole JL, Kurzban GP, Holt SC. 1999. Cystalyisin, a 46-kDa L-cysteine desulfhydrase from *Treponema denticola*: biochemical and biophysical characterization. *Clin Infect Dis*, 28(3):442-450.
- Cox SW, Rodriguez-Gonzalez EM, Booth V, Eley BM. 2006. Secretory leukocyte protease inhibitor and its potential interactions with elastase and cathepsin B in gingival crevicular fluid and saliva from patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Res*, 41(5):477-485.
- Curtis MA, Sterne JA, Price SJ, Griffiths GS, Coulthurst SK, Wilton JM, Johnson NW. 1990. The protein composition of gingival crevicular fluid sampled from male

- adolescents with no destructive periodontitis: baseline data of a longitudinal study. *J Periodontal Res*, 25(1):6-16.
- Darveau RP, Hajishengallis G, Curtis MA. 2012. Porphyromonas gingivalis as a Potential Community Activist for Disease. *J Dent Res*, 91(9):816-820.
- Dashper SG, Seers CA, Tan KH, Reynolds EC. 2011. Virulence Factors of the Oral Spirochete Treponema denticola. *J Dent Res*, 90(6):691-703.
- de Haar SF, Hiemstra PS, van Steenberghe MT, Everts V, Beertsen W. 2006. Role of polymorphonuclear leukocyte-derived serine proteinases in defense against Actinobacillus actinomycetemcomitans. *Infect Immun*, 74(9):5284-5291.
- Deas DE, Mackey SA, McDonnell HT. 2003. Systemic disease and periodontitis: manifestations of neutrophil dysfunction. *Periodontol 2000*, 32(1):82-104.
- Delima AJ, Van Dyke TE. 2003. Origin and function of the cellular components in gingival crevice fluid. *Periodontol 2000*, 31(1):55-76.
- Deng QD, Han Y, Xia X, Kuramitsu HK. 2001. Effects of the oral spirochete Treponema denticola on interleukin-8 expression from epithelial cells. *Oral Microbiol Immunol*, 16(3):185-187.
- Deschner J, Singhal A, Long P, Liu CC, Piesco N, Agarwal S. 2003. Cleavage of CD14 and LBP by a protease from Prevotella intermedia. *Arch Microbiol*, 179(6):430-436.
- Eick S, Pfister W. 2002. Comparison of microbial cultivation and a commercial PCR based method of detection of periodontopathogenic species in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol*, 29(7):638-644.
- Eick S, Puklo M, Adamowicz K, Kantyka T, Hiemstra P, Stennicke H, Guentsch A, Schacher B, Eickholz P, Potempa J. 2014. Lack of cathelicidin processing in Papillon-Lefèvre syndrome patients reveals essential role of LL-37 in periodontal homeostasis. *Orphanet J Rare Dis*, 9(1):1-11.
- Eick S, Rödel J, Einax J, Pfister W. 2002. Interaction of Porphyromonas gingivalis with KB cells: comparison of different clinical isolates. *Oral Microbiol Immunol*, 17(4):201-208.
- Eick S, Reissmann A, Rödel J, Schmidt KH, Pfister W. 2006. Porphyromonas gingivalis survives within KB cells and modulates inflammatory response. *Oral Microbiol Immunol*, 21(4):231-237.
- Eick S, Straube A, Guentsch A, Pfister W, Jentsch H. 2011. Comparison of real-time polymerase chain reaction and DNA-strip technology in microbiological evaluation of periodontitis treatment. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 69(1):12-20.
- Elwell CA, Dreyfus LA. 2000. DNase I homologous residues in CdtB are critical for cytolethal distending toxin-mediated cell cycle arrest. *Mol Microbiol*, 37(4):952-963.

- Fenno JC, Müller KH, McBride BC. 1996. Sequence analysis, expression, and binding activity of recombinant major outer sheath protein (Msp) of *Treponema denticola*. *J Bacteriol*, 178(9):2489-2497.
- Figueredo CM, Fischer RG, Gustafsson A. 2005. Aberrant neutrophil reactions in periodontitis. *J Periodontol*, 76(6):951-955.
- Fitch PM, Roghanian A, Howie SE, Sallenave JM. 2006. Human neutrophil elastase inhibitors in innate and adaptive immunity. *Biochem Soc Trans*, 34(2):279-282.
- Fives-Taylor PM, Meyer DH, Mintz KP. 1996. Virulence Factors of Periodontopathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontol*, 67(3s):291-297.
- Fives-Taylor PM, Meyer DH, Mintz KP, Brissette C. 1999. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Periodontol 2000*, 20(1):136-167.
- Fritz H, Schiessler H, Gieger R, Ohlsson K, Hochstrasser K. 1978. Naturally occurring low molecular weight inhibitors of neutral proteinases from PMN-granulocytes and of kallikreins. *Agent Actions*, 8(1-2):57-64.
- Gängler P, Hoffmann T, Willershausen B, Schwenzer N, Ehrenfeld M. 2005. *Konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie*. Zweite Aufl. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- Gallo RL, Murakami M, Ohtake T, Zaiou M. 2002. Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. *J Allergy Clin Immunol*, 110(6):823-831.
- Garant P. 2003. *Oral Cells and Tissues*. Chicago: Quintessenz-Verlag.
- Graves DT, Liu R, Oates TW. 2007. Diabetes-enhanced inflammation and apoptosis-impact on periodontitis pathosis. *Periodontol 2000*, 45(1):128-137.
- Graves DT, Naguib G, Lu H, Desta T, Amar S. 2005. *Porphyromonas gingivalis* fimbriae are pro-inflammatory but do not play a prominent role in the innate immune response to *P. gingivalis*. *J Endotoxin Res*, 11(1):13-8.
- Grenier D. 1995. Characterization of the trypsin-like activity of *Bacteroides forsythus*. *Microbiology*, 141(4):921-926.
- Guentsch A, Kramesberger M, Sroka A, Pfister W, Potempa J, Eick S. 2011. Comparison of gingival crevicular fluid sampling methods in patients with severe chronic periodontitis. *J Periodontol*, 82(7):1051-1060.
- Guentsch A, Puklo M, Preshaw PM, Glockmann E, Pfister W, Potempa J, Eick S. 2009. Neutrophils in chronic and aggressive periodontitis in interaction with *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Periodontal Res*, 44(3):368-377.
- Guo Y, Nguyen KA, Potempa J. 2010. Dichotomy of gingipains action as virulence factors: from cleaving substrates with the precision of a surgeon's knife to a

- meat chopper-like brutal degradation of proteins. *Periodontol 2000*, 54(1):15-44.
- Guyot N, Bergsson G, Butler MW, Greene CM, Weldon S, Kessler E, Levine RL, O'Neill SJ, Taggart CC, McElvaney NG. 2010. Functional study of elafin cleaved by *Pseudomonas aeruginosa* metalloproteinases. *Biol Chem*, 391(6):705-716.
- Guyot N, Zani ML, Maurel MC, Dallet-Choisy S, Moreau T. 2005. Elafin and its precursor trappin-2 still inhibit neutrophil serine proteinases when they are covalently bound to extracellular matrix proteins by tissue transglutaminase. *Biochem*, 44(47):15610-15618.
- Guzik K, Potempa J. 2008. Friendly fire against neutrophils: proteolytic enzymes confuse the recognition of apoptotic cells by macrophages. *Biochimie*, 90(2):4015-415.
- Haffajee AD, Socransky SS, Patel MR, Song X. 2008. Microbial complexes in supragingival plaque. *Oral Microbiol Immun*, 23(3):196-205.
- Haffajee AD, Yaskell T, Torresyap G, Teles R, Socransky SS. 2009. Comparison between polymerase chain reaction-based and checkerboard DNA hybridization techniques for microbial assessment of subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol*, 36(8):642-649.
- Hajishengallis G, Chavakis T, Hajishengallis E, Lambris JD. 2015. Neutrophil homeostasis and inflammation: novel paradigms from studying periodontitis. *J Leukoc Biol*, 98(4):539-548.
- Hajishengallis G, Darveau RP, Curtis MA. 2012. The keystone-pathogen hypothesis. *Nat Rev Micro*, 10(10):717-725.
- Hamada S, Amano A, Kimura S, Nakagawa I, Kawabata S, Morisaki I. 1998. The importance of fimbriae in the virulence and ecology of some oral bacteria. *Oral Microbiol Immun*, 13(3):129-138.
- Haraguchi A, Miura M, Fujise O, Hamachi T, Nishimura F. 2014. Porphyromonas gingivalis gingipain is involved in the detachment and aggregation of Aggregatibacter actinomycetemcomitans. *Mol Oral Microbiol*, 29(3):131-143.
- Harris JI, Russell RR, Curtis MA, Aduse-Opoku J, Taylor JJ. 2002. Molecular mediators of Porphyromonas gingivalis-induced T-cell apoptosis. *Oral Microbiol Immun*, 17(4):224-230.
- Hasebe A, Yoshimura A, Into T, Kataoka H, Tanaka S, Arakawa S, Ishikura H, Golenbock DT, Sugaya T, Tsuchida N, Kawanami M, Hara Y, Shibata KI. 2004. Biological Activities of Bacteroides forsythus Lipoproteins and Their Possible Pathological Roles in Periodontal Disease. *Infect Immun*, 72(3):1328-1325.

- Hashimoto M, Ogawa S, Asai Y, Takai Y, Ogawa T. 2003. Binding of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae to *Treponema denticola* dentilisin. *FEMS Microbiol Lett*, 226(2):267-271.
- Heitz-Mayfield L, Lang NP. 2010. Comparative biology of chronic and aggressive periodontitis vs. peri-implantitis. *Periodontol 2000*, (53):167-181.
- Hellwig E, Klimek J, Attin T. 2006. *Einführung in die Zahnheilkunde*. Vierte Aufl. Deutschland: Urban & Fischer.
- Henderson B, Nair SP, Ward JM, Wilson M. 2003. Molecular Pathogenicity of the Oral Opportunistic Pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Annu Rev Microbiol*, 57(1):29-55.
- Henderson B, Ward JM, Ready D. 2010. *Aggregatibacter* (*Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans*: a triple A\* periodontopathogen. *Periodontol 2000*, 54(1):78-105.
- Hinode D, Nagata A, Ichimiya S, Hayashi H, Morioka M, Nakamura R. 1992. Generation of plasma kinin by three types of protease isolated from *Porphyromonas gingivalis* 381. *Arch Oral Biol*, 37(10):859-861.
- Hoffmann T, John M, Kerschbaum T, Potthoff P, Reich E, Reis U, Reiter F, Schiffner U, Schroeder E. 2006. *Vierte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS IV)*. Köln: Deutscher Zahnärzte Verlag 2006.
- Hojo K, Nagaoka S, Ohshima T, Maeda N. 2009. Bacterial Interaction in Dental Biofilm Development. *J Dent Res*, 88(11):982-990.
- Holt SC, Ebersole JL. 2005. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and *Tannerella forsythia*: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol 2000*, (38):72-122.
- Hughes CV, Malki G, Loo CY, Tanner AC, Ganeshkumar N. 2003. Cloning and expression of  $\alpha$ -D-glucosidase and N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase from the periodontal pathogen, *Tannerella forsythensis* (*Bacteroides forsythus*). *Oral Microbiol Immun*, 18(5):309-312.
- Huynh QN, Wang S, Tafolla E, Gansky SA, Kapila S, Armitage GC, Kapila YL. 2002. Specific fibronectin fragments as markers of periodontal disease status. *J Periodontol*, 73(10):1101-1110.
- Ikegami A, Honma K, Sharma A, Kuramitsu HK. 2004. Multiple functions of the leucine-rich repeat protein LrrA of *Treponema denticola*. *Infect Immun*, 72(8):4619-4627.
- Imamura T. 2003. The Role of Gingipains in the Pathogenesis of Periodontal Disease. *J Periodontol*, 74(1):111-118.
- Imamura T, Pike RN, Potempa J, Travis J. 1994. Pathogenesis of periodontitis: a major arginine-specific cysteine proteinase from *Porphyromonas gingivalis*

- induces vascular permeability enhancement through activation of the kallikrein/kinin pathway. *J Clin Invest*, 94(1):361-367.
- Imamura T, Potempa J, Tanase S, Travis J. 1997. Activation of blood coagulation factor X by arginine-specific cysteine proteinases (gingipain-Rs) from *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem*, 272(25):16062-16067.
- Into T, Inomata M, Kanno Y, Matsuyama T, Machigashira M, Izumi Y, Imamura T, Nakashima M, Noguchi T, Matsushita K. 2006. Arginine-specific gingipains from *Porphyromonas gingivalis* deprive protective functions of secretory leucocyte protease inhibitor in periodontal tissue. *Clin Exp Immunol*, 145(3):545-554.
- Into T, Takigawa T, Niida S, Shibata KI. 2014. MyD88 deficiency alters expression of antimicrobial factors in mouse salivary glands. *PLoS One*, 9(11):e113333.
- Ishihara K. 2010. Virulence factors of *Treponema denticola*. *Periodontol 2000*, 54(1):117-135.
- Ishikura H, Arakawa S, Nakajima T, Tsuchida N, Ishikawa I. 2003. Cloning of the *Tannerella forsythensis* (*Bacteroides forsythus*) *siaHI* gene and purification of the sialidase enzyme. *J Med Microbiol*, 52(12):1101-1107.
- Jagels MA, Travis J, Potempa J, Pike R, Hugli TE. 1996. Proteolytic inactivation of the leukocyte C5a receptor by proteinases derived from *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*, 64(6):1984-1991.
- Jansen HJ, Grenier D, Van der Hoeven JS. 1995. Characterization of immunoglobulin G-degrading proteases of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *Oral Microbiol Immunol*, 10(3):138-145.
- Jin F, Nathan CF, Radzioch D, Ding A. 1998. Lipopolysaccharide-related stimuli induce expression of the secretory leukocyte protease inhibitor, a macrophage-derived lipopolysaccharide inhibitor. *Infect Immun*, 66(6):2447-2452.
- Jusko M, Potempa J, Karim AY, Ksiazek M, Riesbeck K, Garred P, Eick S, Blom AM. 2012. A metalloproteinase karilysin present in the majority of *Tannerella forsythia* isolates inhibits all pathways of the complement system. *J Immunol*, 188(5):2338-2349.
- Kachalany SC. 2010. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin: from threat to therapy. *J Dent Res*, 89(6):561-570.
- Kachalany SC, Planet PJ, Bhattacharjee MK, Kollia E, DeSalle R, Fine DH, Figurski DH. 2000. Nonspecific Adherence by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Requires Genes Widespread in Bacteria and Archaea. *J Bacteriol*, 182(21):6169-6176.
- Kadowaki T, Yoneda M, Okamoto K, Maeda K, Yamamoto K. 1994. Purification and characterization of a novel arginine-specific cysteine proteinase (argingipain)

- involved in the pathogenesis of periodontal disease from the culture supernatant of *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem*, 269(33):21371-21378.
- Kantyka T, Latendorf T, Wiedow O, Bartels J, Gläser R, Dubin G, Schröder JM, Potempa J, Meyer-Hoffert U. 2009. Elafin is specifically inactivated by RgpB from *Porphyromonas gingivalis* by distinct proteolytic cleavage. *Biol Chem*, 390(12):113-1320.
- Kataoka K, Amano A, Kawabata S, Nagata H, Hamada S, Shizukuishi S. 1999. Secretion of Functional Salivary Peptide by *Streptococcus gordonii* Which Inhibits Fimbria-Mediated Adhesion of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*, 67(8):3780-3785.
- Kato S, Nakashima K, Inoue M, Tomioka J, Nonaka K, Nishihara T, Kowashi Y. 2000. Human epithelial cell death caused by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* infection. *J Med Microbiol*, 49(8):739-745.
- Kigure T, Saito A, Seida K, Yamada S, Ishihara K, Okuda K. 1995. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* in human subgingival plaque at different periodontal pocket depths examined by immunohistochemical methods. *J Periodontal Res*, 30(5):332-341.
- Kinane DF, Peterson M, Stathopoulou PG. 2006. Environmental and other modifying factors of the periodontal diseases. *Periodontol 2000*, 40:107-119
- Kobayashi-Sakamoto M, Isogai E, Hirose K. 2003. *Porphyromonas gingivalis* modulates the production of interleukin 8 and monocyte chemotactic protein 1 in human vascular endothelial cells. *Curr Microbiol*, 46(2):109-114.
- Kolaczowska E, Kubes P. 2013. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*, 13(3):159-175.
- Kolenbrander PE. 2000. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. *Annu Rev Microbiol*, 54:413-437
- Kolenbrander PE, London J. 1993. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *J Bacteriol*, 175(11):3247-3252.
- Korkmaz B, Moreau T, Gauthier F. 2008. Neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G: physicochemical properties, activity and physiopathological functions. *Biochimie*, 90(2):227-242.
- Kortsik C, Elmer A, Tamm I. 2003. Pleural effusion due to *Histoplasma capsulatum* and idiopathic CD4 lymphocytopenia. *Respiration*, 70(1):118-122.
- Kozarov EV, Dorn BR, Shelburne CE, Dunn WA, Progulske-Fox A. 2005. Human Atherosclerotic Plaque Contains Viable Invasive *Actinobacillus actinomycetemcomitans* und *Porphyromonas gingivalis*. *Arterioscler Thromb Vascu Biol*, 25(3):e17-e18.

- Krauss JL, Potempa J, Lambris JD, Hajishengallis G. 2010. Complementary Tolls in the periodontium: how periodontal bacteria modify complement and Toll-like receptor responses to prevail in the host. *Periodontol 2000*, 52(1):141-162.
- Kretschmar S, Yin L, Roberts F, London R, Flemmig TT, Arushanov D, Kaiyala K, Chung WO. 2012. Protease inhibitor levels in periodontal health and disease. *J Periodontal Research*, 47(2):228-235.
- Kroes I, Lepp PW, Relman DA. 1999. Bacterial diversity within the human subgingival crevice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(25):14547-14552.
- Ksiazek M, Mizgalska D EN, Scavenius C, Thogersen IB, Potempa J. 2015. Miropin, a novel bacterial serpin from the periodontopathogen *Tannerella forsythia*, inhibits a broad range of proteases by using different peptide bonds within the reactive center loop. *J Biol Chem*, 290(1):658-670.
- Kuboniwa M, Amano A, Shizukuishi S, Nakagawa I, Hamada S. 2001. Specific antibodies to *Porphyromonas gingivalis* Lys-gingipain by DNA vaccination inhibit bacterial binding to hemoglobin and protect mice from infection. *Infect Immun*, 69(5):2972-2979.
- Lally ET, Kieba IR, Sato A, Green CL, Rosenbloom J, Korostoff J, Wang JF, Shenker BJ, Ortlepp S, Robinson MK, Billings PC. 1997. RTX Toxins Recognize a  $\beta 2$  Integrin on the Surface of Human Target Cells. *J Biol Chem*, 272(48):30463-30469.
- Lamster IB, Oshrain RL, Fiorello LA, Celenti RS, Gordon JM. 1988. A comparison of 4 methods of data presentation for lysosomal enzyme activity in gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol*, 15(6):347-352.
- Lamster IB, Oshrain RL, Harper DS, Celenti RS, Hovliaras CA, Gordon JM. 1988. Enzyme activity in crevicular fluid for detection and prediction of clinical attachment loss in patients with chronic adult periodontitis. Six month results. *J Periodontol*, 59(8):516-523.
- Lang N, Bartold PM, Cullinan M, Jeffcoat M, Mombelli A, Murakami S, Page RC, Papapanou P, Tonetti M, Van Dyke T. 1999. Consensus Report: Aggressive Periodontitis. *Ann Periodontol*, 4(1):53-53.
- Laugisch O, Schacht M, Guentsch A, Kantyka T, Sroka A, Stennicke HR, Pfister W, Sculean A, Potempa J, Eick S. 2012. Periodontal pathogens affect the level of protease inhibitors in gingival crevicular fluid. *Mol Oral Microbiol*, 27(1):45-56.
- Lee W, Pankoski L, Zekavat A, Shenker BJ. 2004. *Treponema denticola* immunoinhibitory protein induces irreversible G1 arrest in activated human lymphocytes. *Oral Microbiol Immun*, 19(3):144-149.
- Li J, Helmerhorst EJ, Leone CW, Troxler RF, Yaskell T, Haffajee AD, Socransky SS, Oppereheim FG. 2004. Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *J Appl Microbiol*, 97(6):1311-1318.



- Listgarten MA, Mayo H, Amsterdam M. 1973. Ultrastructure of the attachment device between coccal and filamentous microorganisms in "corn cob" formations of dental plaque. *Arch Oral Biol*, 18(5):651-656.
- Lopez N. 2000. Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* und *Prevotella intermedia* in adult periodontitis. *J Periodontol*, 71(6):948-954.
- Lovegrove J. 2004. Dental plaque revisited: bacteria associated with periodontal disease. *J N Z Soc Periodontol*, (87):7-21.
- Marsh PD, Bradshaw DJ. 1995. Dental plaque as a biofilm. *J Ind Microbiol*, 15(3):169-175.
- Marsh P, Martin M. 2003. *Orale Mikrobiologie*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- Mekalanos JJ. 1992. Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J Bacteriol*, 174(1):1-7.
- Meyer DH, Rose JE, Lippman JE, Fives-Taylor PM. 1999. Microtubules Are Associated with Intracellular Movement and Spread of the Periodontopathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun*, 67(12):6518-6525.
- Mintz KP. 2004. Identification of an extracellular matrix protein adhesin, EmaA, which mediates the adhesion of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to collagen. *Microbiology*, 150(8):2677-2688.
- Miura M, Hamachi T, Fujise O, Maeda K. 2005. The prevalence and pathogenic differences of *Porphyromonas gingivalis* fimA genotypes in patients with aggressive periodontitis. *J Periodontal Res*, 40(2):147-152.
- Moore W, Moore L. 1994. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol 2000*, 5(1):66-77.
- Nelson D, Potempa J, Kordula T, Travis J. 1999. Purification and characterization of a novel cysteine proteinase (periodontain) from *Porphyromonas gingivalis*. Evidence for a role in the inactivation of human alpha1-proteinase inhibitor. *J Biol Chem*, 274(18):12245-12251.
- Nibali L. 2015. Aggressive Periodontitis: microbes and host response, who to blame?. *Virulence*, 6(3):223-228.
- Nishida E, Hara Y, Kaneko T, Ikeda Y, Ukai T, Kato I. 2001. Bone resorption and local interleukin-1alpha and interleukin-1beta synthesis induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *J Periodontal Res*, 36(1):1-8.
- Nourshargh S, Hordijk PL, Sixt M. 2010. Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(5):366-378.

- O'Brien-Simpson NM, Veith PD, Dashper SG, Reynolds EC. 2004. Antigens of bacteria associated with periodontitis. *Periodontol 2000*, 35:101-134
- Oleksy A, Banbula A, Bugno M, Travis J, Potempa J. 2002. Proteolysis of interleukin-6 receptor (IL-6R) by *Porphyromonas gingivalis* cysteine proteinases (gingipains) inhibits interleukin-6-mediated cell activation. *Microb Pathog*, 32(4):173-181.
- Olsen I, Hajishengallis G. 2016. Major neutrophil functions subverted by *Porphyromonas gingivalis*. *J Oral Microbiol*, 83:0396
- Onishi S, Honma K, Liang S, Stathopoulou P, Klnane D, Hajishengallis G, Sharma A. 2008. Toll-Like Receptor 2-Mediated Interleukin-8 Expression in Gingival Epithelial Cells by the *Tannerella forsythia* Leucine-Rich Repeat Protein BspA. *Infect Immun*, 76(1):198-205.
- Page RC. 1991. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. *J Periodontol Res*, 26(3):230-242.
- Page RC, Schroeder HE. 1976. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest*, 34(3):235-249.
- Page R, Schroeder H. 1982. *Periodontitis in man and other animals. A comparative review..* Basel: S. Karger.
- Papapanou PN. 1999. Epidemiology of periodontal diseases: an update. *J Int Acad Periodontol*, 1(4):110-116.
- Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, CN LA, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE. 2001. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol*, 183(12):3770-3783.
- Pathirana RD, O'Brien-Simpson NM, Reynolds EC. 2010. Host immune responses to *Porphyromonas gingivalis* antigens. *Periodontol 2000*, 52(1):218-237.
- Pfundt R, van Ruissen F, van Vlijmen-Willems IM, Alkemade HA, Zeeuwen PL, Jap PH, Dijkman H, Fransen J, Croes H, van Erp PE, Schalkwijk J. 1996. Constitutive and inducible expression of SKALP/Elafin provides anti-elastase defense in human epithelia. *J Clin Invest*, 98(6):1389-1399.
- Pham CT. 2008. Neutrophil serine protease fine-tunes the inflammatory response. *Int J Biochem Cell Biol*, 40(6-7):1317-1333.
- Pike RN, Potempa J, McGraw W, Coetzer TH, Travis J. 1996. Characterization of the binding activities of proteinase-adhesin complexes from *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol*, 178(10):2876-2882.
- Posch G, Pabst M, Brecker L, Altmann F, Messner P, Schäffer C. 2011. Characterization and Scope of S-layer Protein O-Glycosylation in *Tannerella forsythia*. *J Biol Chem*, 286(44):38714-38724.

- Potempa J, Banbula A, Travis J. 2000. Role of bacterial proteinases in matrix destruction and modulation of host responses. *Periodontol 2000*, 24(1):153-192.
- Potempa J, Pike RN. 2009. Corruption of innate immunity by bacterial proteases. *J Innate Immun*, 1(2):70-87.
- Potempa M, Potempa J. 2012. Protease-dependent mechanisms of complement evasion by bacterial pathogens. *Biol Chem*, 393(9):873-888.
- Potempa M, Potempa J, Kantyka T, Nguyen KA, Wawrzonek K, Manandhar SP, Popadiak K, Riesbeck K, Eick S, Blom AM. 2009. Interpain A, a cysteine proteinase from *Prevotella intermedia*, inhibits complement by degrading complement factor C3. *PLoS Pathog*, 5(2):e1000316.
- Potempa J, Sroka A, Imamura T, Travis J. 2003. Gingipains, the major cysteine proteinases and virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*: structure, function and assembly of multidomain protein complexes. *Curr Protein Pept Sci*, 4(6):397-407.
- Puklo M, Guentsch A, Hiemstra PS, Eick S, Potempa J. 2008. Analysis of neutrophil-derived antimicrobial peptides in gingival crevicular fluid suggests importance of cathelicidin LL-37 in the innate immune response against periodontogenic bacteria. *Oral Microbiol Immunol*, 23(4):328-335.
- Raja M, Ummer F, Dhivakar CP. 2014. *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*-A Tooth Killer?. *J Clin Diagn Res*, 8(8):13-16.
- Roghanian A, Williams SE, Sheldrake TA, Brown TI, Oberheim K, Xing Z, Howie SE, Sallenave JM. 2006. The Antimicrobial/Elastase Inhibitor Elafin Regulates Lung Dendritic Cells and Adaptive Immunity. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 34(5):634-642.
- Sabet M, Lee SW, Nauman RK, Sims T, Um HS. 2003. The surface (S-) layer is a virulence factor of *Bacteroides forsythus*. *Microbiology*, 149(12):3617-3627.
- Saito T, Ishihara K, Kato T, Okuda K. 1997. Cloning, expression, and sequencing of a protease gene from *Bacteroides forsythus* ATCC 43037 in *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 65(11):4888-4891.
- Sakamoto M, Suzuki M, Umeda M, Ishikawa I, Benno Y. 2002. Reclassification of *Bacteroides forsythus* (Tanner et al. 1986) as *Tannerella forsythensis* corrig., gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 52(3):841-849.
- Sallenave JM, Shulmann J, Crossley J, Jordana M, Gauldie J. 1994. Regulation of secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI) and elastase-specific inhibitor (ESI/elafin) in human airway epithelial cells by cytokines and neutrophilic enzymes. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 11(6):733-741.
- Sanderink R, Bernhardt H, Knoke M, Meyer J, Weber C, Weiger R. 2004. *Curriculum orale Mikrobiologie und Immunologie:[Grundlagen der oralen*

*Mikrobiologie; Mikroorganismen in der Mundhöhle; die gesunde und die kranke Mundhöhle; angewandte Mikrobiologie und Immunologie*]. Berlin: Quintessenz-Verlag.

- Scapini P, Cassatella MA. 2014. Social networking of human neutrophils within the immune system. *Blood*, 124(5):710-719.
- Sekot G, Posch G, Messner P, Matejka M, Rausch-Fan X, Andrukhov O., Schäffer C. 2001. Potential of the *Tannerella forsythia* S-layer to Delay the Immune Response. *J Dent Res*, 90(1):109-114.
- Sela MN. 2001. Role of *Treponema Denticola* in Periodontal Diseases. *Crit Rev Oral Biol Med*, 12(5):399-413.
- Seymour GJ, Gemmell E, Reinhardt RA, Eastcott J, Taubman MA. 1993. Immunopathogenesis of chronic inflammatory periodontal disease: cellular and molecular mechanisms. *J Periodontal Res*, 28(6 Pt 2):478-486.
- Shao MX, Nadel JA. 2005. Neutrophil Elastase Induces MUC5AC Mucin Production in Human Airway Epithelial Cells via a Cascade Involving Protein Kinase C, Reactive Oxygen Species, and TNF- $\alpha$ -Converting Enzyme. *J Immunol*, 175(6):4009-4016.
- Sharma A. 2010. Virulence mechanisms of *Tannerella forsythia*. *Periodontol 2000*, 54(1):106-116.
- Sharma A, Inagaki S, Honma K, Sfintescu C, Baker PJ, Evans RT. 2005. *Tannerella forsythia*-induced Alveolar Bone Loss in Mice Involves Leucine-rich-repeat BspA Protein. *J Dent Res*, 84(5):462-467.
- Shaw L, Wiedow O. 2011. Therapeutic potential of human elafin. *Biochem Soc Trans*, 39(5):1450-1454.
- Shenker BJ, Hoffmaster RH, Zekavat A, Yamaguchi N, Lally ET, Demuth DR. 2001. Induction of apoptosis in human T cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin is a consequence of G2 arrest of the cell cycle. *J Immunol*, 167(1):435-441.
- Shibata Y, Miwa Y, Hirai K, Fujimura S. 2003. Purification and partial characterization of a dipeptidyl peptidase from *Prevotella intermedia*. *Oral Microbiol Immunol*, 18(3):196-198.
- Sigusch B, Klinger G, Holtz H, Süss J. 1992. In vitro phagocytosis by crevicular phagocytes in various forms of periodontitis. *J Periodontol*, 63(6):496-501.
- Simonson LG, McMahon KT, Childers DW, Morton HE. 1992. Bacterial synergy of *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis* in a multinational population. *Oral Microbiol Immunol*, 7(2):111-112.
- Simpson W, Olczak T, Genco CA. 2004. Lysine-specific gingipain K and heme/hemoglobin receptor HmuR are involved in heme utilization in *Porphyromonas gingivalis*. *Acta Biochim Pol-english edition-*, 253-262

- Slots J. 1999. Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis in periodontal disease: introduction. *Periodontol 2000*, 207-13
- Slots J, Reynolds HS, Genco RJ. 1980. Actinobacillus actinomycetemcomitans in Human Periodontal Disease: a Cross-Sectional Microbiological Investigation. *Infect Immun*, 29(3):1013-1020.
- Slots J, Ting M. 1999. Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis in human periodontal disease: occurrence and treatment. *Periodontol 2000*, 2082-121
- Socransky SS, Haffajee AD. 2002. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000*, 2812-55
- Socransky SS, Haffajee AD. 2005. Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000*, 38135-187
- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini M, Smith C, Kent R. 1998. Microbial complexes in subgingival Plaque. *J Clin Periodontol*, 25(2):134-144.
- Stathopoulou PG, Galicia JC, Benakanakere MR, Garcia CA PO, Kinane DF. 2009. Porphyromonas gingivalis induce apoptosis in human gingival epithelial cells through a gingipain-dependent mechanism. *BMC Microbiology*, 9(1):1-12.
- Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Edwin RC. 2010. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trend Immunol*, 31(8):318-324.
- Sundqvist G. 1993. Pathogenicity and virulence of black-pigmented gram-negative anaerobes. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 6(2-3):125-137.
- Sztukowska M, Bugno M, Potempa J, Travis J, Kurtz DM. 2002. Role of rubrerythrin in the oxidative stress response of Porphyromonas gingivalis. *Mol Microbiol*, 44(2):479-488.
- Tada H, Sugawara S, Nemoto E, Takahashi N, Imamura T, Potempa J, Travis J, Shimauchi H, Takada H. 2002. Proteolysis of CD14 on human gingival fibroblasts by arginine-specific cysteine proteinases from Porphyromonas gingivalis leading to down-regulation of lipopolysaccharide-induced interleukin-8 production. *Infect Immun*, 70(6):3304-3307.
- Tada H, Sugawara S, Nemoto E., Imamura T, Potempa J, Travis J, Shimauchi H, Takada H.. 2003. Proteolysis of ICAM-1 on Human Oral Epithelial Cells by Gingipains. *J Dent Res*, 82(10):796-801.
- Taggart CC, Lowe GJ, Greene CM, Mulgrew AT, O'Neill SJ, Levine RL, McElvaney NG. 2001. Cathepsin B, L, and S cleave and inactivate secretory leucoprotease inhibitor. *J Biol Chem*, 276(36):33345-33352.
- Takahashi, N (2003). Acid-neutralizing activity during amino acid fermentation by Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia and Fusobacterium nucleatum. *Oral Microbiology and Immunology* , 18 (2), 109-113.

- Takahashi N, Sato T. 2001. Preferential Utilization of Dipeptides by Porphyromonas gingivalis. *J Dent Res*, 80(5):1425-1429.
- Takeuchi Y, Umeda M, Sakamoto M, Benno Y, Huang Y, Ishikawa I. 2001. Treponema socranskii, Treponema denticola, and Porphyromonas gingivalis are associated with severity of periodontal tissue destruction. *J Periodontol*, 72(10):1354-1363.
- Tanner AC, Izard J. 2006. Tannerella forsythia, a periodontal pathogen entering the genomic era. *Periodontol 2000*, 4288-113
- Tanner AC, Listgarten MA, Ebersole JL, Strzempko MN. 1986. Bacteroides forsythus sp. nov., a slow-growing, fusiform Bacteroides sp. from the human oral cavity. *Int J Syst Evol Microbiol*, 36(2):213-221.
- Tanner, AC, Maiden, MF, Macuch, PJ, Murray, LL, Kent, Jr RL (1998). Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis. *J Clin Periodontol*, 25 (2), 85-98.
- Torresyap G, Haffajee AD, Uzel NG, Socransky SS. 2003. Relationship between periodontal pocket sulfide levels and subgingival species. *J Clin Periodontol*, 30(11):1003-1010.
- Travis J, Pike R, Imamura T, Potempa J. 1994. The role of proteolytic enzymes in the development of pulmonary emphysema and periodontal disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 150(6 Pt 2):143-146.
- Uehara A, Muramoto K, Takada H, Sugawara S. 2003. Neutrophil Serine Proteinases Activate Human Nonepithelial Cells to Produce Inflammatory Cytokines Through Protease-Activated Receptor 2. *J Immunol*, 170(11):5690-5696.
- Uehara A, Sugawara S, Muramoto K, Takada H. 2002. Activation of Human Oral Epithelial Cells by Neutrophil Proteinase 3 Through Protease-Activated Receptor-2. *J Immunol*, 169(8):4594-4603.
- Uitto VJ, Overall CM, McCulloch C. 2003. Proteolytic host cell enzymes in gingival crevice fluid. *Periodontol 2000*, 31(1):77-104.
- Uitto VJ, Pan YM, Leung WK, Larjava H, Ellen RP, Finlay BB, McBride BC. 1995. Cytopathic effects of Treponema denticola chymotrypsin-like proteinase on migrating and stratified epithelial cells.. *Infect Immun*, 63(9):3401-3410.
- Ujiie Y, Oida S, Gomi K, Arai T, Fukae M. 2007. Neutrophil elastase is involved in the initial destruction of human periodontal ligament. *J Periodontal Res*, 42(4):325-330.
- Umemoto T, Li M, Namikawa I. 1997. Adherence of Human Oral Spirochetes by Collagen-Binding Proteins. *Microbiol Immun*, 41(12):917-923.
- Van Seuning I, Audie JP, Gosselin B, Lafitte JJ, Davril M. 1995. Expression of human mucous proteinase inhibitor in respiratory tract: a study by in situ hybridization. *J Histochem Cytochem*, 43(6):645-648.

- van Winkelhoff AJ, Slots J. 1999. Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis in nonoral infections. *Periodontol* 2000, 20(1):122-135.
- Wiedow O, Meyer-Hoffert U. 2005. Neutrophil serine proteases: potential key regulators of cell signalling during inflammation. *J Intern Med*, 257(4):319-328.
- Williams SE, Brown TI, Roghanian A, Sallenave JM. 2006. SLPI and elafin: one glove, many fingers. *Clin Sci (Lond)*, 110(1):21-35.
- Wingrove JA, DiScipio RG, Chen Z, Potempa J, Travis J, Hugli TE. 1992. Activation of complement components C3 and C5 by a cysteine proteinase (gingipain-1) from Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis. *J Biol Chem*, 267(26):18902-18907.
- Wyss C. 1989. Dependence of proliferation of Bacteroides forsythus on exogenous N-acetylmuramic acid. *Infect Immun*, 57(6):1757-1759.
- Yang HW, Huang YF, Chan Y, Chou MY. 2005. Relationship of Actinobacillus actinomycetemcomitans serotypes to periodontal condition: prevalence and proportions in subgingival plaque. *Eur J Oral Sci*, 113(1):28-33.
- Yang HW, Huang YF, Chou MY. 2004. Occurrence of Porphyromonas gingivalis and Tannerella forsythensis in periodontally diseased and healthy subjects. *J Periodontol*, 75(8):1077-1083.
- Yin L, Swanson B, An J, Hacker BM, Silverman GA, Dale BA, Chung WO. 2010. Differential effects of periopathogens on host protease inhibitors SLPI, elafin, SCCA1, and SCCA2. *J Oral Microbiol*, 25070
- Yun PL, DeCarlo AA, Hunter N. 1999. Modulation of Major Histocompatibility Complex Protein Expression by Human Gamma Interferon Mediated by Cysteine Proteinase-Adhesin Polyproteins of Porphyromonas gingivalis. *Infect Immun*, 67(6):2986-2995.
- Zani ML, Nobar SM, Lacour SA, Lemoine S, Boudier C, Bieth JG, Moreau T. 2004. Kinetics of the inhibition of neutrophil proteinases by recombinant elafin and pre-elafin (trappin-2) expressed in Pichia pastoris. *Eur J Biochem*, 271(12):2370-2378.
- Zhang JH, Dong Z., Chu L.. 2010. Hydrogen sulfide induces apoptosis in human periodontium cells. *J Periodontal Res*, 45(1):71-78.

## **Anhang**

### **Danksagung**

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. habil. W. Pfister und Frau Prof. Dr. med. dent. habil. S. Eick für die Überlassung des Themas, sowie die exzellente Unterstützung sowohl bei der Durchführung der Experimente als auch bei der Verfassung der schriftlichen Arbeit. Beide hatten während der langen Zeit immer ein offenes Ohr für anstehende Fragen und waren stets zu unkomplizierter, freundlicher und schneller Hilfestellung bereit.

Für die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente möchte ich mich besonders bei Tomasz Kantyka und Aneta Sroka aus der Abteilung Mikrobiologie der Fakultät für Biochemie, Biophysik und Biotechnologie der Jagellonian Universität Krakau bedanken.

Großer Dank gilt auch meiner Frau Constanze für ihren motivierenden Zuspruch und ihr verständnisvolles Erdulden meiner geistigen Abwesenheit bei den alltäglichen Kleinigkeiten, die während der Verfassung dieser Dissertation oftmals an mir unbemerkt vorbeirauschten.



## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name: Martin Schacht  
geboren am: 17.05.1984  
Familienstand: verheiratet, 3 Kinder  
wohnhaft in: Hufelandstraße 16, 99425 Weimar

### **Schul Ausbildung**

1990-1994 Grundschlule, Rostock  
1994- 2000 Ernst-Barlach-Gymnasium, Rostock  
2000-2001 Austauschschüler an der Dyer County High School, TN, USA  
2001-2004 Käthe-Kollwitz-Gymnasium, Rostock  
2004 Abitur

### **Wehrdienst**

2004-2005 Wehrdienst im Leitsanitätszentrum 120, Rostock  
2005 Einstellung als Sanitätsoffiziersanwärter bei der Bundeswehr

### **Studium**

10/2005 - 12/2010 Zahnmedizinstudium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena  
12/2010 Appropation als Zahnarzt

### **Beruflicher Werdegang**

01/2011-06/2011 Truppenzahnarzt im SanZ Osterholz-Scharmbeck  
07/2011-12/2011 Elternzeit  
01/2012-06/2016 Truppenzahnarzt und Leiter Zahnarztgruppe SanVersZ Bad Salzungen  
seit 07/2016 Truppenzahnarzt im SanVersZ Bad Frankenhausen

### **Publikation**

Laugisch O, Schacht M, Guentsch A, Kantyka T, Sroka A, Stennicke HR, Pfister W, Sculean A, Potempa J, Eick S. 2012. Periodontal pathogens affect the level of protease inhibitors in gingival crevicular fluid. *Mol Oral Microbiol*, 27(1):45-56.

Weimar im Oktober 2016

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. W. Pfister und Prof. Dr. S. Eick

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Weimar, den 9.10.2016

Martin Schacht